

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**LAS INTERACCIONES ENTRE REPLICACIÓN,
SEGREGACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN
MODELOS EUCARIOTAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Estefanía Monturus de Carandin

Bajo la dirección de los doctores

Jorge Bernardo Schvartzman
Dora B. Krimer

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**LAS INTERACCIONES ENTRE REPLICACIÓN,
SEGREGACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR
EN MODELOS EUCARIOTAS**

TESIS DOCTORAL

ESTEFANÍA MONTURUS DE CARANDINI

Madrid, 2011

La presente tesis doctoral titulada “Las interacciones entre replicación, segregación y diferenciación celular en modelos eucariotas”, ha sido realizada por Estefanía Monturus de Carandini, bajo la dirección de los Doctores Jorge Bernardo Schwartzman y Dora B. Krimer, en el Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo de Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Estefanía Monturus de Carandini
para optar al título de Doctor

VºBº de los Directores de Tesis

Dr. Jorge Bernardo Schwartzman

Dra. Dora B. Krimer

VºBº del Tutor de Tesis

Dr. Manuel Díez

Agradecimientos

Nunca imaginé que escribiría los agradecimientos de mi tesis doctoral en un hospital infantil en Basilea. Aunque sí se piensa bien es un lugar que lleva a la reflexión y a la meditación, el silencio lo inunda todo tan sólo roto por el llanto de un bebé demandando atención y cariño, como el que yo he recibido durante estos años. Sentada en una típica mesa blanca acompañando a mi hija Jimena, de tan sólo 14 días de edad, me dispongo a recordar a todas aquellas personas que han sido significantes durante esta etapa de mi vida que cierro al término de estos agradecimientos. Es mi pequeño homenaje a todos vosotros. Gracias por estos años, han sido inolvidables.

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Jorge Bernardo Schwartzman y a la Dra. Débora Krimer, la oportunidad que me brindaron al permitirme realizar esta tesis doctoral en su laboratorio. Gracias por vuestras enseñanzas y vuestra comprensión. Asimismo quería dar las gracias al Dr. Pablo Hernández por sus ideas y sus aportaciones a mi trabajo de laboratorio.

Siguiendo por el CIB, mi “casa” durante todo este tiempo, quiero comenzar por dar las gracias a Marisa, “mi Marisita”, ¿Qué haríamos sin ti? Mi mentora, no sólo en el tema de laboratorio sino en cualquier ámbito de la vida. Siempre a mi lado en el momento que la necesité, dispuesta a darlo todo, incluso llevándose los problemas a casa para intentar resolverlos. Gracias por estos años, esta tesis es tuya también.

A mis compañeros de laboratorio, que he tenido la gran suerte de conocer. Comenzaré por el principio, gracias Zaira, nuestra “post-doc”, contigo aprendí a dominar muchas técnicas de laboratorio y lo más importante, me descubriste la seguridad para valerme por mí misma y resolver las dificultades. Gracias María T. por enseñarme que con constancia y esfuerzo todo se puede conseguir en la vida por complicado que parezca. Gracias María, mi compañera de fatigas durante estos años. Nos incorporamos al “labo” el mismo día, hemos vivido mucho juntas, alegrías y tristezas, risas y lágrimas. Gracias por tu entusiasmo por la ciencia, por tu alegría, por tu disposición a ayudar en cualquier situación. Simplemente gracias por ser tú, vales mucho. Estoy segura de que tengo una amiga para siempre. Gracias Virginia, mi compañera “superenrollada” en esto de la ciencia. Me has enseñado lo que es el sacrificio por el trabajo. Siempre pendiente de mí y mostrando tu cariño en todo momento. Gracias Jorge, uno de los grandes

descubrimientos de mis últimos años. Me habría gustado coincidir más tiempo contigo, aunque ha sido suficiente para agradecerte tu apoyo, tu disposición y tu entusiasmo, has sido como un soplo de aire fresco para el laboratorio.

A mis compañeros del CIB, con los que he compartido muchas experiencias dentro y fuera del laboratorio. Gracias Eva, has sido un pilar básico durante estos años, siempre preocupada por mí, dispuesta a ayudar y enseñar lo que hiciera falta. Te llevo siempre conmigo. Gracias Cris, por tu buen humor y tu cariño. La de buenos ratos que hemos compartido con tus historias para no dormir, eres genial, no cambies. Gracias Bea, por tu apoyo y tu cercanía. Gracias Gonzalo, siempre preocupado por mí. Gracias MaríaJo, hemos compartido poco tiempo pero ha sido intenso, me has enseñado que con esfuerzo y empeño todo se puede conseguir. Gracias por tu buen humor y tu sabiduría. Gracias Javi y Leo, por estar ahí siempre que os he necesitado. Y no quiero olvidarme de Yolí, Bea G y Marta, gracias chicas.

Continuando por mi familia, gracias Papá, por apoyarme siempre en todo, incluso en la decisión de dejarte en Zaragoza para irme a Madrid a comenzar mi carrera investigadora, los dos sabemos que fue una decisión dura y difícil. Gracias por confiar en mí y estar a mi lado siempre que te he necesitado. Eres un ejemplo de generosidad y optimismo.

Gracias Mamá, sé que desde el cielo me has apoyado y acompañado durante estos años. Me has dado la fuerza para seguir adelante en los momentos más duros, para luchar y conseguir los objetivos propuestos. Gracias por enseñarme a valorar todas las cosas por insignificantes que parezcan. Te llevo siempre en mi corazón.

Gracias a mi hermano Esteban, por enseñarme a ser paciente y a saber diferenciar lo importante de lo que no lo es tanto. Por escucharme en todo momento. Por tu rectitud y perfección en todo lo que haces, veo en ti el reflejo de Mamá. Gracias por quererme tanto.

Gracias Merce, por tratarme y preocuparte siempre por mí como si de tu propia hija se tratara. Gracias Alberto, por tu alegría y tu compañía, consigues llenar el espacio vacío.

Y por último, y por ello no menos importante, sino todo lo contrario, a la persona que me ha acompañado y aguantado durante todos los días de esta etapa y sin la que esta tesis no habría encontrado su fin, a Gustavo, mi complemento, mi cómplice, mi alma gemela. Estos años a tu lado han sido los más felices de mi vida. Hemos formado una familia y has hecho realidad uno de mis sueños, ser madre. Gracias por levantarme cada vez que me caí, por no dejar que me rindiera sin luchar por lo que quiero, por creer en mí, por ver siempre lo positivo de todas las situaciones por difícil que parezca e incluso arrancarme una sonrisa, por apoyarme en todas las decisiones tomadas. Simplemente gracias por amarme.

Para finalizar, gracias Jimena por la compañía y la ilusión que me has dado durante los nueve meses de escritura de la tesis, eres muy especial.

Estefanía

Índice

1	Introducción	14
1.1	La topología del ADN	15
1.1.1	El superenrollamiento del ADN	15
1.1.2	Las topoisomerasas	17
1.1.3	La topología del ADN durante la replicación y la organización del genoma	20
1.2	La segregación de los cromosomas eucariotas	22
1.2.1	Cohesinas y condensinas: organizan y segregan el genoma	23
1.2.2	La topología y sus implicaciones en la segregación cromosómica	23
1.2.3	Los encadenados del ADN	25
1.3	Organización y estructura del ADN alrededor de los nucleosomas	26
1.4	El estrés torsional de los cromosomas de levaduras.	27
1.4.1	YACs (Yeast autonomous chromosome)	29
1.5	Métodos de análisis del estado topológico del ADN	33
1.5.1	Análisis de intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional	34
1.5.2	Estudio de la replicación durante la diferenciación en metazoos	37
1.5.3	Iniciación de la replicación en metazoos	38
1.5.4	La línea celular MEL como modelo de reprogramación <i>in vitro</i>	39
2	Objetivos	43
3	Materiales y métodos	45
3.1	Cultivos celulares	45
3.1.1	Línea celular	45
3.1.2	Condiciones de cultivo	45
3.1.3	Ensayos de diferenciación	45
3.1.4	Inducción de células MEL quiescentes	46

3.2	Preparación de células para su análisis mediante citometría de flujo.	47
3.2.1	Análisis del ciclo celular mediante BrdU	47
3.3	Inmunohistoquímica.	47
3.4	Análisis de fibras de ADN mediante la técnica ADN combing	48
3.4.1	Marcaje e inclusión en tacos de agarosa de bajo punto de fusión.	48
3.4.2	Extracción de ADN genómico.	49
3.4.3	Inmunodetección.	49
3.4.4	Adquisición de imágenes y análisis de datos.	50
3.5	Preparación y análisis de ARN.	50
3.5.1	Extracción y purificación de ARN.	50
3.5.2	RT-PCR.	51
3.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.	51
3.5.4	Análisis de la expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.	52
3.6	Material biológico y medios de cultivo	52
3.6.1	Material biológico	52
3.6.2	Medios y cultivo de <i>E.coli</i>	53
3.6.3	Medios y cultivo de <i>S.cerevisiae</i>	53
3.7	Preparación de células de <i>S. cerevisiae</i> para su análisis mediante citometría de flujo	55
3.8	Construcción de minicromosomas y cromosomas circulares y lineales	56
3.9	Transformación de <i>E. coli</i>	59
3.10	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	59
3.11	Preparación de ADN	60
3.11.1	Extracción de ADN de <i>E. coli</i>	60
3.11.2	Extracción de ADN de <i>S. cerevisiae</i>	61
3.12	Digestiones enzimáticas	63
3.12.1	Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de doble cadena	63

3.12.2 Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de cadena sencilla	63
3.13 Análisis de ADN	63
3.13.1 Electroforesis en geles de agarosa	63
3.13.2 Transferencia del ADN a soportes sólidos	65
3.13.3 Marcaje e hibridación de ácidos nucleicos	65
3.13.4 Secuenciación	66
4 Resultados	67
4.1 Estudio de moléculas encadenadas en <i>S. cerevisiae</i> .	67
4.1.1 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma en presencia y en ausencia de Top2	67
4.1.2 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados en la estirpe con el doble degrón pRS316 top2-td cdc20-td durante el ciclo celular.	78
4.1.3 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados en la estirpe pRS316 smc2-8 top2-td durante el ciclo celular.	93
4.2 Estudio de la replicación y segregación de cromosomas circulares y lineales en <i>S. cerevisiae</i> .	96
4.2.1 Construcción de cromosomas artificiales circulares y lineales.	96
4.2.2 Estudio del ciclo celular de células de <i>S. cerevisiae</i> de la estirpe top2-td transformadas con los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM.	99
4.2.3 Estudio de la topología de pYAC_MEM durante la replicación y la segregación celular en presencia y en ausencia de Top2.	101
4.2.4 Análisis de la iniciación, progresión y terminación de la replicación de pYAC_MEM mediante electroforesis bidimensional.	102

4.2.5	Análisis de la iniciación, progresión y terminación de la replicación de YAC_MEM mediante electroforesis bidimensional.	111
4.3	Estudio del ciclo celular de células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con minicromosomas circulares y lineales .	113
4.3.1	Estudio de la topología de YAC_MEM durante la replicación y la segregación celular en presencia y en ausencia de Top2.	116
4.4	Análisis de la replicación durante la diferenciación terminal de células MEL	119
4.4.1	Cinética de la diferenciación de células MEL tratadas con HMBA	120
4.4.2	Análisis de la dinámica de replicación durante la diferenciación de las células MEL	121
4.4.3	Análisis de la replicación bajo condiciones de quiescencia	131
4.4.4	Análisis del <i>pool</i> de dNTPs durante la diferenciación de las células MEL	137
4.4.5	Análisis del daño a ADN producido por el tratamiento con HMBA	139
4.4.6	Análisis del estado de la cromatina durante la diferenciación de las células MEL	141
5	Discusión	145
5.1	La interacción entre superenrollamiento y desencadenamiento durante la replicación	145
5.2	El complejo condensina, un elemento clave para la segregación cromosómica	146
5.2.1	Las condensinas reconfiguran la topología de los cromosomas mitóticos	146
5.2.2	Las condensinas promueven el desencadenamiento de las cromátidas hermanas	148
5.3	Desplazamiento asimétrico de las horquillas de replicación	150
5.3.1	Estructura del centrómero	151
5.3.2	Implicaciones de la colisión entre replicación y transcripción	153

5.4	Iniciación de la replicación en secuencias teloméricas	154
5.5	Posibles artefactos que afectan a los patrones de replicación de cromosomas artificiales.	155
5.6	La tensión torsional del cromosoma lineal se disipa por los telómeros permitiendo la segregación en ausencia de Top2.	157
5.7	Los orígenes dormidos promueven la completa replicación del genoma durante la diferenciación.	159
5.8	El silenciamiento de la replicación durante la diferenciación en eucariotas	161
5.9	El pool de nucleótidos modula la elección del origen y el espacio entre orígenes	162
5.10	La heterocromatinización del ADN regula la actividad de los orígenes de replicación	164
5.11	Los cambios epigenéticos afectan a la replicación en eucariotas	165
5.12	La programación de los orígenes de replicación y la estructura cromosómica	166
6	Conclusiones	167
7	Bibliografía	169
8	Publicaciones	183

Abreviaturas

ACS	<i>Autonomously Consensus Sequence</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARS	<i>Autonomously Replicating Sequence</i>
B+	Benzidina positivo
BFU-E	Unidades formadoras de brotes eritroides
BrdU	5'-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Álbumina de suero bovino
CEN	Secuencia centromérica
CFU-E	Unidades formadoras de colonias eritroides
CldU	5'-cloro-2'-desoxiuridina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Nucleótidos TriFosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EPO	Eritropoyetina
EPO-R	Receptor de eritropoyetina
F-MuL-V	<i>Friend murine leukemia virus</i>
HDAC	<i>Histone DeAcetylases</i>
HMBA	N,N'-Hexamethylene-Bis-Acetamida
HP1α	Proteína de la Heterocromatina 1 subunidad α
IdU	5'-iodo-2'-desoxiuridina
IP	Ioduro de Propidio
Kb	Kilobases
Lk	Índice de Ligamiento
MEL	<i>Murine ErythroLeukemia</i>
ORC	<i>Origin Recognition Complex</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pre-RC	<i>Pre-Replicative Complex</i>

RNR	RiboNucleotido Reductasa
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a PCR
SMARD	<i>Single Molecule Analysis Replicated ADN</i>
SSFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEL	Secuencia Telomérica
Top1	Topoisomera I eucariota
Top2	Topoisomerasa II eucariota
Top IV	Topoisomerasa IV procariota
Tw	Índice de Torsión
Wr	Índice de Superenrollamiento
γH2AX	Subunidad γ de la Histona 2AX

Resumen

En las células eucariotas los procesos de replicación, segregación y diferenciación celular se encuentran íntimamente coordinados. La replicación de los genomas eucariotas ocurre a partir de numerosos orígenes distribuidos a lo largo de los cromosomas. Finalmente, las dos cromátidas hermanas resultantes deben separarse y dirigirse hacia los polos opuestos de la célula una vez que la replicación haya finalizado.

La replicación y la segregación de las cromátidas hermanas están temporalmente separadas. En la presente tesis hemos comprobado que es esencial mantenerlas juntas después de su replicación y condensadas durante su segregación. La formación del huso mitótico y la unión de la condensina Smc2 inducen el superenrollamiento positivo de los encadenados de ADN al término de la replicación, lo que permite a la Top2 ser notablemente eficiente su desencadenamiento, favoreciendo así la correcta segregación de las cromátidas hermanas.

La topología del ADN durante la replicación controla la activación y el avance de las horquillas. En dominios topológicamente cerrados es posible observar una ralentización e incluso un bloqueo de las horquillas de replicación, así como una acumulación de encadenados en ausencia de Top2. Por el contrario, en dominios topológicamente abiertos, como son los minicromosomas lineales, la iniciación de la replicación puede ocurrir además en las secuencias telómericas. En estos minicromosomas lineales, la tensión helicoidal causada por la replicación y la transcripción se disipa por los extremos libres de los telómeros y por ello tanto la replicación como la segregación de las cromátidas hermanas ocurren normalmente en ausencia de Top2.

El cese de la replicación del ADN a medida que las células se diferencian ha recibido hasta ahora escasa atención. La diferenciación terminal de las células eritroleucémicas (MEL), un modelo utilizado en el estudio de la reprogramación de células tumorales hacia la diferenciación terminal, se caracteriza por la activación de nuevos orígenes de replicación asociada a una disminución de la velocidad de avance de

las horquillas. Este cese gradual de la replicación está relacionado además con una mayor heterocromatinización de los cromosomas.

Tanto la replicación y la segregación del ADN así como la diferenciación celular terminal siguen un complejo programa espacio-temporal que se desarrolla bajo el control de mecanismos epigenéticos íntimamente asociados a la organización funcional del núcleo y a la estructura de la cromatina.

Abstract

In eukaryotic cells DNA replication, segregation and cell differentiation are closely coordinated. Replication begins at numerous replication origins distributed along the chromosomes. Finally, once replication is over, the newly replicated sister chromatids must segregate and travel to the opposite poles of the dividing cell.

Replication and segregation of sister chromatids occur at different times. In the current doctoral thesis we confirmed that sister chromatids must remain close to each other during and immediately after replication and they must condense for segregation. Their association with the mitotic spindle and the Smc2 condensin force catenated molecules to become positively supercoiled. This positive supercoiling favours decatenation by Top2, which in turns facilitate the sister chromatids appropriate segregation.

DNA topology controls the activation of replication origins as well as the progression of replication forks. In topological closed domains, replication forks slow down and may eventually stall. On the contrary, in topological open domains, as is the case for linear minichromosomes, initiation of DNA replication can also occur at the telomeric sequences on chromosome ends. In these linear minichromosomes the torsional tension caused by the progression of replication and transcription machineries dissipates thru chromosome ends. This explains why in these linear minichromosomes replication and segregation of sister chromatids can occur in the absence of Top2.

DNA replication fading as cells approach terminal differentiation received poor attention up to now. Here we investigated HMBA-induced terminal differentiation in murine erythroleukemia (MEL) cell lines, which is considered a model system to study reprogramming of tumor cells towards terminal differentiation. We found this process is characterized by the activation of dormant replication origins associated to the slow down of replication forks progression. This gradual fading of DNA replication could be due to a progressive chromatin heterochromatinization.

Replication and segregation of DNA as well as cell differentiation follows a complex space-temporal program that is functionally linked to epigenetic mechanisms that regulate and transform chromatin organization.

1 Introducción

El descubrimiento de que el ADN posee una estructura de doble hélice en la que las dos cadenas se conectan por uniones de pares de bases fue un hito en la Biología del siglo XX. A partir de ese momento aumentó el interés por conocer cómo se duplicaba la molécula y qué factores intervenían en el proceso. Actualmente se sabe que la replicación del ADN implica una serie definida de estadios: la definición de un sitio de iniciación; el reclutamiento de una helicasa capaz de separar las dos cadenas de ADN; la anexión de una ADN polimerasa y otros factores que facilitan el procesamiento de la misma, etc. Este marco de actuación es común a todos los organismos celulares y sin embargo existen diferencias significativas a lo largo de la escala evolutiva. Así, bacterias y eucariotas replican su genoma de forma distinta. El cromosoma bacteriano posee un solo origen de replicación localizado en una posición fija y definido por una secuencia estricta, mientras que los cromosomas eucariotas replican a partir de múltiples orígenes. En eucariotas unicelulares, como es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los múltiples orígenes de replicación también responden a secuencias específicas denominadas ARS, de "autonomously replicating sequences". En eucariotas superiores por el contrario, no se han definido claramente secuencias consenso capaces de actuar como orígenes de replicación. Es aceptado por una gran parte de la comunidad científica que los sitios de iniciación de la replicación en estos casos no está definido por la secuencia de ADN o al menos no sólo por la secuencia de ADN, sino que influye el contexto genómico, la conformación de la cromatina y la topología del ADN.

En la presente tesis se han estudiado modelos de replicación, segregación y diferenciación eucariotas, tanto en organismos unicelulares, tomando como modelo la levadura *Saccaromyces cerevisiae*, como en células de organismos multicelulares. En este último caso se analizaron células de ratón inmortalizadas con un complejo vírico, capaces de recomponer un modelo de diferenciación eritropoyética.

1.1 La topología del ADN

La topología del ADN es una disciplina a medio camino entre las Matemáticas y la Biología Molecular que estudia la forma que adopta la doble hélice en un contexto tridimensional. Los aspectos topológicos de la estructura del ADN están íntimamente ligados con el hecho de que las dos hebras de ADN se entrelazan repetidas veces. Desenredar las dos hebras, lo que necesariamente ocurre en la mayoría de los procesos genéticos celulares, es un proceso complicado que puede llevar a situaciones deletéreas, lo cual avala la necesidad de un estudio profundo a nivel topológico.

Poco después del descubrimiento de la estructura de la doble cadena de ADN, comenzó a apreciarse la utilidad de la aplicación de la topología para comprender la estructura que adoptaba la doble hélice. En los años 60, Vinograd y colaboradores descubrieron las diferentes formas topológicas del ADN circular de doble cadena del virus del polio (Vinograd, Lebowitz et al. 1965). Estos autores denominaron estereoisómeros al resultado de la unión de las hebras de ADN que estaban entrelazadas entre sí un número distinto de veces. Esta observación fue años más tarde, extendida a todas las moléculas de ADN circular de doble cadena (Cozzarelli 1980). La observación de que el ADN estaba superenrollado junto con el descubrimiento de las topoisomerasas (Wang 1971) sentaron las bases de esta nueva disciplina, a la que se denominó “topología del ADN” (Wang, 2002).

1.1.1 El superenrollamiento del ADN

El superenrollamiento del ADN es la consecuencia estructural de la unión de las hebras de la doble hélice. Es una propiedad exclusiva de dominios topológicos cerrados que se pierde si uno o los dos extremos de la doble hélice se libera. En esos casos, la tensión torsional interna acumulada desaparece ya que las hebras de ADN pueden girar libremente sobre sí mismas disipando dicha tensión por los extremos libres (Bauer, Crick et al. 1980). El término superenrollamiento refleja la conformación del ADN: una hélice de ADN enrollada sobre otra hélice de orden mayor. Se han definido dos formas

de superenrollamiento, el plectonémico característico del ADN procariota y el solenoidal típico de eucariotas, donde el ADN se enrolla alrededor de los nucleosomas.

La relación entre la topología y la estructura o geometría del ADN se define mediante los términos de índice de ligamiento (Lk) (DiNardo, Voelkel et al.), índice de torsión (Tw) e índice de superenrollamiento (Wr). El Lk, se define matemáticamente como el número de veces que una cadena de doble hélice cruza a la otra cadena en un plano (Bates and Maxwell 1997). Es una constante topológica que no puede variar y corresponde siempre a un número entero. La única manera de cambiar el Lk de una molécula se produce al introducir una rotura en una o en ambas cadenas de ADN, permitiendo la rotación libre de una o de las dos hebras de ADN (Wang 1996). Por lo tanto, la constante Lk se define por las dos variables geométricas anteriormente citadas, el Tw y el Wr de la siguiente manera:

$$Lk = Tw + Wr \quad (1)$$

El Tw indica el número de veces que las dos cadenas de ADN giran una vuelta completa en el espacio alrededor del eje axial de la doble hélice. El Wr es la medida del superenrollamiento en sí misma, o lo que es lo mismo, el número de veces que el eje de la doble hélice gira sobre sí mismo en un plano. Como ya se ha definido, el Lk es una constante invariable, por lo que según la fórmula (1) el Tw y el Wr deben variar y compensarse a la vez que se deforma la molécula de ADN.

El Lk no es la única característica invariable de los ADNs circulares. En el proceso de circularización, las moléculas de ADN de mayor longitud pueden llegar a formar nudos de diferentes tipos y complejidades. En raras ocasiones se han detectado nudos en células vivas los cuales han sido relacionados con procesos de recombinación (Wasserman and Cozzarelli 1985).

Otro tipo de uniones de tipo invariable ocurren cuando dos o más moléculas de ADN se entrecruzan durante un proceso de circularización. En estos casos las estructuras se denominan encadenados y se forman principalmente al final de la replicación del ADN, como ya se detallará más adelante.

La naturaleza circular de los cromosomas bacterianos y el gran tamaño de los cromosomas eucariotas impiden una solución simple a muchos de los problemas topológicos que acompañan a los intercambios de ADN que se producen en la célula (Wang 1998). En la mayoría de los procesos que involucra a las moléculas de ADN, las hebras de la doble hélice deben desenrollarse y separarse de forma temporal, como en la transcripción o la recombinación, o de forma permanente, como en la replicación ¿Cómo ocurre este despliegue y cómo revierte a la posición conformacional inicial? Un grupo especial de enzimas son las encargadas de resolver este problema, las llamadas topoisomerasas.

1.1.2 Las topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas capaces de modificar el estado topológico del ADN en la célula. Estas enzimas introducen roturas transitorias pasando una hebra de ADN a través de una abertura en la cadena opuesta, en el caso de las topoisomerasa de tipo I. Las topoisomerasas de tipo II pueden cortar ambas cadenas de una molécula de ADN y pasar una región del dúplex de la misma o de una molécula diferente, a través del hueco generado en la ruptura (Champoux 2001). Sólo éstas últimas son capaces de desencadenar y desanudar moléculas circulares de ADN.

La rotura del ADN por las topoisomerasas es consecutiva a la formación de una unión fosfodiéster transitoria entre un residuo de tirosina de la proteína y uno de los extremos de la hebra rota. La topología del ADN se puede modificar durante el tiempo que se mantenga esta unión covalente abierta y finalmente la enzima se libera cuando el ADN se vuelve a unir (Champoux 2001). Durante estos procesos las topoisomerasas cambian el Lk dando lugar a moléculas con la misma masa pero con un nivel de superenrollamiento distinto denominadas topoisómeros. Además de alterar el superenrollamiento de un dominio topológico cerrado, pueden asimismo promover el encadenamiento y desencadenamiento de ADN circulares y el anudamiento o la resolución del mismo.

La estructura del ADN conduce a situaciones topológicas difíciles que deben ser resueltas por las topoisomerasas. Por otro lado, el estado topológico del ADN en sí debe ser finamente ajustado para optimizar las funciones del mismo. Ejemplos de la actuación de las topoisomerasas en este sentido pueden ser: la separación de las hebras de ADN durante la replicación; la relajación del ADN provocada por la translocación de la ARN polimerasa durante la transcripción (Wang 1998); la relajación del ADN provocada por la asociación con histonas y otras proteínas; la relajación parcial del superenrollamiento negativo del ADN de bacterias provocado por la transcripción de algunos promotores (Wallis, Chrebet et al. 1989); el desencadenamiento de los cromosomas una vez replicados y antes de dividirse,

1.1.2.1 ADN Topoisomerasas de tipo I

Las topoisomerasas de tipo I introducen roturas transitorias de cadena simple alterando el Lk de una molécula circular de ADN en valores de ± 1 , al hacer rotar una vuelta completa a la cadena rota sobre la intacta (Brown and Cozzarelli 1981). Dentro del tipo I, dependiendo de si se unen al fosfato 5' o 3' del ADN interrumpido se clasifican en topoisomerasas IA o IB, respectivamente (Champoux 2001). Dentro de las topoisomerasas de tipo I de procariotas, *Escherichia coli* posee dos topoisomerasas de tipo IA: la Topo I (Wang 1971) que relaja el superenrollamiento (-) generado por detrás de la horquilla durante la transcripción (Liu and Wang 1987) y la Topo III cuyo papel biológico no está del todo definido. Se sabe que la Topo III interacciona con la helicasa RecQ (Harmon, DiGate et al. 1999) y que podría estar implicada en la segregación cromosómica y en la maduración de los intermediarios de recombinación (Zhu and Skoultchi 2001).

Las topoisomerasas de tipo I de las células eucariotas son capaces de relajar tanto superenrollamiento positivo (+) como negativo (-). En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen dos topoisomerasas que pertenecen al grupo IB y IA, respectivamente. La Topo I (TopI) (Wang, 1985) actúa de eslabón giratorio permitiendo el movimiento de las horquillas durante la replicación del ADN. Actúa en la región no replicada entre dos horquillas relajando eficientemente el superenrollamiento positivo y negativo generado

por delante y por detrás de la horquilla de replicación (Liu and Wang 1987; Giaever and Wang 1988; Kim and Wang 1989). La Topo I participa también en la eliminación del superenrollamiento asociado a la transcripción (Champoux 2001). La Topo III por su lado, es dispensable para el crecimiento celular y está implicada en la recombinación meiótica. Se ha demostrado que existe una asociación funcional de la Topo III con la helicasa Sgs1 previniendo la formación de intermediarios letales durante la recombinación del ADN y durante la replicación (Gangloff, McDonald et al. 1994).

1.1.2.2 ADN Topoisomerasas de tipo II

Las topoisomerasas de tipo II cortan transitoriamente ambas cadenas de la doble hélice del ADN y transportan otra doble hélice a través del hueco interrumpido para finalmente volver a unir los extremos de la molécula (Wang 1996; Wang 1998; Champoux 2001). De esta manera alteran el Lk de las moléculas en valores de ± 2 (Brown and Cozzarelli 1981; Roca and Wang 1994). Se dividen en dos subfamilias, IIA y IIB, estando mejor caracterizadas las de tipo IIA (Champoux 2001).

En *E. coli* existen dos topoisomerasas de tipo II: la ADN girasa y la Topo IV. La ADN girasa (Gellert, Mizuuchi et al. 1976) es la única capaz de convertir la energía de la hidrólisis del ATP en superenrollamiento negativo. Es asimismo altamente eficiente en la relajación del superenrollamiento positivo generado por delante de las horquillas de replicación debido a la acción de las helicasas. La Topo IV por otra parte, (Kato, Nishimura et al. 1990) posee una estructura tetramérica homóloga a la de la girasa aunque al igual que sus homólogas eucariotas no es capaz de actuar sobre el superenrollamiento. Su principal papel in vivo consiste en separar las cromátidas hermanas recién replicadas durante la segregación celular (Adams, Shekhtman et al. 1992).

Las topoisomerasas homodiméricas eucariotas de tipo II pueden relajar ambos superenrollamientos durante la replicación y la transcripción y llevar a cabo el desencadenamiento de las cromátidas hermanas. En *S. cerevisiae* sólo se conoce dentro de este tipo la Topo II (Top2) (DiNardo, Voelkel et al. 1984; Holm, Goto et al. 1985).

En los años 90, Roca y colaboradores proponen un mecanismo para explicar la forma de actuación de la Topo II (Roca, 1992). La enzima se une a un segmento de ADN adyacente a un sitio activo con un residuo de tirosina y rompe las dos hebras de ADN formando una "puerta" o segmento G (del inglés *gate*). Un segundo segmento T (del inglés *transfer*) pasa entre los dominios de unión N-terminal del ATP. La unión de ATP dimeriza estos dominios, atrapa el segmento T en una pinza y se trasloca a través de la puerta G. La hidrólisis del ATP libera la pinza y reajusta la enzima para la siguiente reacción. Si el segmento G y el T pertenecen a la misma molécula, se observará una variación en el Lk de ± 2 . En cambio, si los segmentos G y T pertenecen a moléculas diferentes resultará en un encadenamiento o desencadenamiento. Este mecanismo permite llevar a cabo funciones vitales para la célula como son la replicación y la segregación cromosómica.

Recientemente, las topoisomerasas han despertado un gran interés en el ámbito científico y clínico dado el reconocimiento de su papel crucial en la topología del ADN y su posible actuación como diana terapéutica. Se han identificado una gran variedad de fármacos capaces de actuar frente a las topoisomerasas, muchos de los cuales provocan lesiones citotóxicas atrapando a las enzimas en complejos covalentes con el ADN. Estos venenos de topoisomerasas incluyen tanto a antimicrobianos como quimioterápicos antitumorales, algunos de los cuales ya se utilizan ampliamente en clínica.

1.1.3 La topología del ADN durante la replicación y la organización del genoma

Para iniciar la replicación, en la mayoría de los seres vivos, el ADN debe estar negativamente superenrollado facilitando así la separación de las hebras parentales en el origen de replicación (Marians, Minden et al. 1986; Funnell, Baker et al. 1987; Crisona, Strick et al. 2000). Una vez iniciada la replicación, la elongación se lleva a cabo mediante un complejo conjunto de enzimas conocido como el replisoma. Por delante del replisoma, la ADN helicasa va separando las hebras parentales que posteriormente serán utilizadas como molde. Esta separación produce una tensión positiva del dúplex por delante de la horquilla (Peter, Ullsperger et al. 1998; Alexandrov, Cozzarelli et al. 1999) que debe ser eliminada para evitar el colapso de la misma.

En bacterias, la ADN girasa disminuye el índice de ligamiento de la porción no replicada compensando la acumulación de superenrollamiento positivo del dúplex conforme avanza la replicación (Cozzarelli 1980; Marians 1992; Levine, Hiasa et al. 1998). La procesividad de la ADN helicasa es mayor que la de la ADN girasa y la horquilla de replicación avanza más rápido de lo que es capaz la girasa de introducir superenrollamiento negativo (Peter, Ullsperger et al. 1998). En etapas tempranas de la replicación, cuando la porción no replicada es suficientemente amplia, varias moléculas de girasas pueden funcionar en paralelo para conseguir un nivel suficiente de compensación. Conforme la porción no replicada disminuye, la girasa tiene menos espacio para actuar (requiere alrededor de 150 pares de bases para unirse al ADN) (Champoux and Been, 1980), lo que conlleva a la acumulación de superenrollamiento positivo. Para solventar este problema, Champoux y Been propusieron un modelo en el que sugerían que si la horquilla de replicación era libre para rotar, el superenrollamiento positivo creado por delante de la horquilla se difundiría creando entrecruzamientos entre las dúplex hijas detrás de la horquilla. Llamaron pre-encadenados a los cruces entre cromátidas hermanas de la porción replicada (Ullsperger et al. 1995) para distinguirlos del superenrollamiento de la región no replicada, que se convertirán en encadenados al no ser eliminados al final de la replicación. Además, se propuso que la Topo IV, la principal desencadenasa de *E. coli* (Zechiedrich, Khodursky et al. 1997), podría asistir a la girasa para compensar el superenrollamiento positivo acumulado. Poco tiempo después, en un ensayo *in vitro* de plásmidos parcialmente replicados y mediante microscopia electrónica se confirmó (Peter, Ullsperger et al. 1998) la difusión del superenrollamiento a través de la horquilla. De acuerdo con el modelo expuesto, la ADN girasa introduciría superenrollamiento negativo por delante de la horquilla mientras que la topo IV eliminaría los pre-encadenados formados detrás de la horquilla, compensando con estas acciones la acumulación de superenrollamiento positivo durante la replicación. Es importante matizar que para que el superenrollamiento difunda a través de las horquillas de replicación los duplexes hijos deben ser capaces de rotar libremente alrededor de la horquilla.

La organización del genoma en eucariotas, a diferencia de los procariotas, es el enrollamiento del ADN alrededor de las histonas lo cual provoca un superenrollamiento

negativo en los cromosomas eucariotas. Las topoisomerasas I y II de eucariotas son capaces de eliminar la acumulación de superenrollamiento positivo generado por delante de la horquilla que, unido a la asociación de los nucleosomas a las dos cromátidas hermanas detrás de la horquilla (Lucchini, Wellinger et al. 2001) permiten el correcto avance de las horquillas. Estas dos topoisomerasas no actúan en la zona replicativa al mismo tiempo, modulando sus funciones a través de la activación-desactivación de los orígenes de replicación. La topo II está envuelta en el ensamblaje del complejo pre-replicativo mientras que la topo I está relacionada con la activación de los orígenes (Abdurashidova, Radulescu et al. 2007).

En *S. cerevisiae*, la topo I relaja el superenrollamiento positivo y negativo generado por delante y por detrás de la horquilla de replicación (Liu and Wang 1987; Giaever and Wang 1988; Kim and Wang 1989). Se ha demostrado que los mutantes nulos para la topo I son viables (Goto and Wang 1985; Thrash, Bankier et al. 1985) y es en este caso la topo II la encargada de relajar el superenrollamiento positivo y negativo. En contraposición, la topo II es esencial para la viabilidad celular y su presencia es crucial durante la mitosis en el momento de la segregación y separación de las cromátidas hermanas (DiNardo, Voelkel et al. 1984).

1.2 La segregación de los cromosomas eucariotas

En las células eucariotas, la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas están temporalmente separadas. Por lo tanto, es esencial mantener las cromátidas hermanas juntas y condensadas desde el momento de su generación en la fase S del ciclo celular hasta el momento de su separación durante la mitosis, en la transición de metafase a anafase. La metafase es una fase crucial en la que las cromátidas hermanas condensadas se unen mediante cohesinas y se orientan a través de los husos mitóticos, preparándose para la segregación cromosómica. La fidelidad de la segregación cromosómica implica un equilibrio entre las fuerzas producidas por los microtúbulos hacia los polos y las fuerzas ejercidas por la cromatina (Bloom and Joglekar 2010). Cada cromosoma está unido a los husos de los microtúbulos mediante el cinetocoro, una estructura proteína-ADN que se encuentra en el centrómero (Bouck

and Bloom 2007; Cheeseman and Desai 2008). Debido a la unión de los cinetocoros hermanos al aparato mitótico, se genera tensión entre las cromátidas hermanas que difunde a la cromatina pericentromérica (Goshima and Yanagida 2000; Tanaka, Fuchs et al. 2000).

1.2.1 Cohesinas y condensinas: organizan y segregan el genoma

Las cohesinas y condensinas son complejos de proteínas esenciales que determinan la correcta organización de los cromosomas en las células eucariotas (Hirano 2005). Estos complejos mantienen la unión entre las cromátidas hermanas desde el final de la replicación hasta la transición metafase–anafase, evento esencial para la correcta segregación de los cromosomas. Las condensinas en conjunto con las topoisomerasas tipo II (Top2) son necesarias para la condensación mitótica de los cromosomas. La Top2 además es la encargada de desencadenar las cromátidas recién replicadas, lo cual es imprescindible para la terminación de la replicación y la separación de las cromátidas durante anafase (Nitiss 2009). Ambos complejos están formados por proteínas SMC (*Structural Maintenance Chromosome*) y proteínas reguladoras no-SMC. Entre las primeras las proteínas Smc1 y Smc3 pertenecen al complejo de cohesinas y las Smc2 y Smc4 al de condensinas. Los heterodímeros de proteínas SMC interactúan formando una bisagra o estructura en forma de V mientras que las subunidades no-SMC se unen a ambas subunidades SMC formando una estructura en forma de anillo (Nasmyth and Haering 2005). El mecanismo por el cual los complejos de condensinas pueden interactuar con el ADN e inducir cambios conformacionales es poco conocido hasta ahora.

1.2.2 La topología y sus implicaciones en la segregación cromosómica

El desencadenamiento de las cromátidas hermanas en células eucariotas requiere el paso a través de mitosis, debido a la presencia necesaria del huso mitótico (Holm, Goto et al. 1985). Sin embargo, se ha observado que las cromátidas hermanas aparecen

desencadenadas antes de su física separación mediada por el huso mitótico (Uhlmann, Wernic et al. 2000; Oliveira, Hamilton et al. 2010).

El desencadenamiento en procariotas es promovido por el superenrollamiento modulado por la topo IV y la girasa, tal como se discutió en apartados anteriores. En bacterias, la topo IV es la enzima encargada del desencadenamiento celular *in vivo* y su función depende del tipo de superenrollamiento; el papel de la ADN girasa por otra parte, es introducir superenrollamiento negativo en el ADN transformándolo en un sustrato más accesible para la topo IV (Zechiedrich, Khodursky et al. 1997; Hardy, Crisona et al. 2004; Martinez-Robles, Witz et al. 2009). En intermediarios de replicación formados *in vivo*, se ha demostrado que el encadenamiento y el superenrollamiento negativo compiten entre sí. Las moléculas altamente encadenadas están limitadas en el superenrollamiento negativo que pueden albergar; cuando el encadenamiento disminuye, la tensión liberada se compensa con superenrollamiento negativo indispensable para la progresión de la separación de las cromátidas hermanas (Martinez-Robles, Witz et al. 2009).

Las observaciones en procariotas llevaron a plantear la existencia de mecanismos similares en eucariotas. Se propuso estudiar si cambios en la topología del ADN durante la mitosis ayudarían al desencadenamiento de las cromátidas hermanas. Para realizar este análisis se utilizó una estirpe de *S. cerevisiae* con una mutación de tipo degrón inducible por temperatura, top2-td, que permite la completa degradación de la Top2 y por consiguiente la acumulación de encadenados. Para monitorizar los resultados se utilizó un minicromosoma circular, pRS316, que funciona como un elemento extracromosómico y por lo tanto mimetiza el comportamiento de los cromosomas de levadura.

1.2.3 Los encadenados del ADN

En topología, el término encadenado se refiere a la unión topológica de dos o más moléculas circulares de ADN, entrelazadas entre sí un número variable de veces. La presencia de ADN encadenado procede probablemente de un intermediario o producto final de la replicación de moléculas circulares de ADN. Vinograd y colaboradores observaron los primeros encadenados en el ADN mitocondrial de células HeLa mediante microscopía electrónica (Clayton and Vinograd 1967; Hudson and Vinograd 1967). Posteriormente, se han descrito encadenados en una variedad de sistemas incluyendo plásmidos bacterianos (Kupersztoch and Helinski 1973; Novick, Smith et al. 1973; Sakakibara, Suzuki et al. 1976) y el virus SV40 (Jaenisch and Levine 1973).

Existen tres tipos de encadenados: de tipo A o Cat A (Figura 1A), en los que las dos moléculas de ADN circular poseen una rotura de cadena sencilla disipando todo el superenrollamiento adquirido previamente, siendo ambas moléculas OCs, completamente relajadas; de tipo B o Cat B (Figura 1B), en los cuales sólo una de las dos moléculas circulares está relajada, mientras que la otra está covalentemente cerrada, pudiendo albergar superenrollamiento; y de tipo C o Cat C (Figura 1C), en donde ambas moléculas circulares están covalentemente superenrolladas. Estos últimos son los más abundantes *in vivo*. Además, existen dos parámetros topológicos adicionales para definir los encadenados: n , número de cruces que presentan dos moléculas encadenadas al proyectarlas sobre un plano; y el Ca , número de encadenamientos, cuyo valor es siempre la mitad del número de cruces.

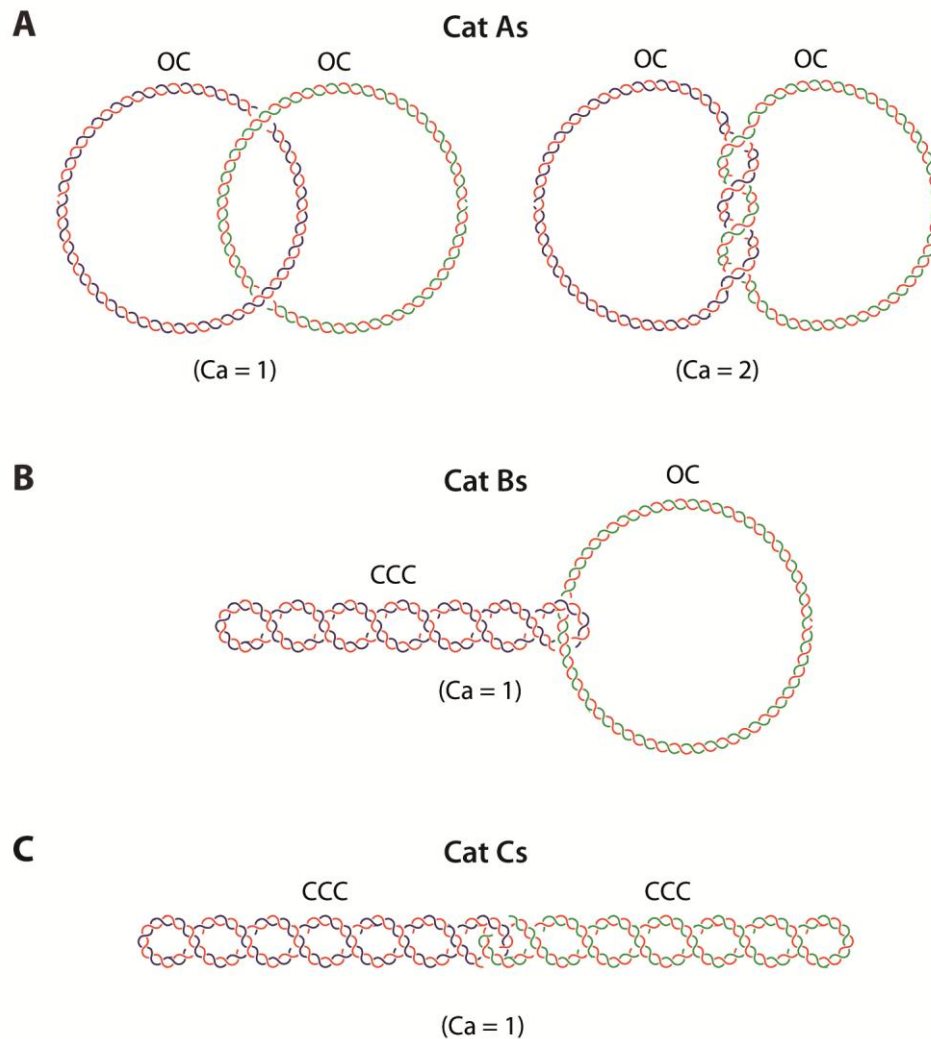


Figura 1. Tipos de encadenados del ADN. A. Se muestran encadenados de tipo Cat As, formados por dos moléculas relajadas u OCs. B. Se muestran encadenados de tipo Cat B formado por una molécula relajada y una superenrollada con un encadenamiento entre ellas. C. Se muestran encadenados de tipo Cat C formado por dos moléculas superenrolladas con un encadenamiento entre ellas. Ca corresponde al número de encadenamientos que presenta la molécula.

1.3 Organización y estructura del ADN alrededor de los nucleosomas

El ADN se empaqueta con histonas y otras proteínas para formar la fibra de cromatina y encajar de forma eficiente en el núcleo (Khorasanizadeh 2004; Luger and Hansen 2005; Luger 2006). La unidad básica de repetición de la cromatina es el nucleosoma formado por 146 pb que se enrollan alrededor de un octámero de histonas para formar una estructura en forma de disco. Las histonas son proteínas básicas altamente conservadas en todos los eucariotas. Cada nucleosoma contiene dos dímeros

de histonas H2A-H2B y un tetrámero (H3-H4)₂. La histona H1 ocupa una posición fuera de la parte central del nucleosoma y actúa a modo de conector entre nucleosomas (Varshavsky, Bakayev et al. 1976; Simpson 1978).

Uno de los aspectos enigmáticos de la cromatina es el mecanismo que envuelve a la generación de su estructura durante la replicación, ¿Las nuevas histonas sintetizadas se mezclan con las antiguas histonas en nucleosomas individuales? Este problema se investigó mediante un simple experimento marcando una histona de las ocho que forman un nucleosoma en cada fase S del ciclo que dio lugar a tres modelos distintos. (Leffak, Grainger et al. 1977). Asumiendo que se empaquetan aleatoriamente en los nucleosomas, cada octámero debería contener una media de una histona marcada y siete sin marcar, lo que se conoce como ensamblaje aleatorio (Freedlender, Taichman et al. 1977). Por el contrario, si las nuevas histonas se empaquetan en el mismo nucleosoma, obtendríamos el ensamblaje conservativo (Jackson, Granner et al. 1976; Seale 1976) donde todas las histonas del octámero estarían marcadas. Finalmente, si un tetrámero antiguo se junta con un tetrámero de nueva síntesis, tendríamos un ensamblaje semiconservativo donde la mitad de las histonas están marcadas (Jackson and Chalkley 1981; Russev and Hancock 1981). El ensamblaje semiconservativo es el más aceptado en la actualidad.

El empaquetamiento de la cromatina no es uniforme en la totalidad del genoma. Las regiones que contienen genes transcripcionalmente activos están menos compactadas (eucromatina), mientras que otras correspondientes a zonas transcripcionalmente silenciadas (heterocromatina) presentan un mayor grado de compactación.

1.4 El estrés torsional de los cromosomas de levaduras.

La tensión helicoidal del ADN tiene profundas implicaciones en la mayoría de los intercambios del genoma. El hecho de poder alterar el superenrollamiento facilita o dificulta la fusión de los dúplex así como sus interacciones con factores estructurales y

reguladores (Wang, Peck et al. 1983; Vologodskii and Cozzarelli 1994). La tensión helicoidal del ADN promueve la formación de superenrollamiento que contribuye a la yuxtaposición de zonas distantes del ADN y al plegamiento global del mismo (Huang, Schlick et al. 2001).

En bacterias, los cromosomas son circulares y el ADN está organizado en dominios topológicos independientes (Deliuss and Worcel 1974; Sinden and Pettijohn 1981; Postow, Hardy et al. 2004) que presentan diferentes niveles de tensión helicoidal. En las células eucariotas, los cromosomas son lineales y el ADN está plegado en fibras de cromatina complejas. Es difícil en estos casos la identificación de dominios topológicos cerrados y es en la actualidad un tema de discusión por resolver (Eissenberg, Cartwright et al. 1985; Esposito and Sinden 1988; Freeman and Garrard 1992). Para abordar esta cuestión se requieren nuevas herramientas que permitan examinar el estado helicoidal del ADN cromosómico para interpretar los factores que determinan la generación, transmisión y disipación de las fuerzas de enrollamiento *in vivo*. Hasta ahora, la replicación y la transcripción (Liu, 1987; Brill, 1988; (Giaever, 1988) unidos a la actividad de las diferentes topoisomerasas (Salceda, 2006) son los principales factores conocidos involucrados en la generación y relajación de la tensión helicoidal en células eucariotas.

La transcripción del ADN impone la rotación axial del dúplex relativa al complejo ARN- polimerasa. Esta rotación es rápidamente impedida por las interacciones cercanas que anclan el ADN a otras estructuras o, simplemente, por la gran rotación que arrastra al ADN a plegarse. Por consiguiente, la tensión helicoidal positiva aumenta por delante del avance de la polimerasa y origina tensión negativa detrás de ella. Análogamente, también se incrementa la tensión helicoidal positiva por delante de las horquillas de replicación (Schvartzman and Stasiak 2004). Las topoisomerasas del ADN relajan esta tensión helicoidal produciendo roturas temporales de simple o doble cadena.

Roca y colaboradores indujeron la acumulación de estrés helicoidal positivo en el ADN de *S. cerevisiae*. Mediante el análisis de *microarrays*, examinaron cómo las alteraciones en la transcripción se propagaban a través de los cromosomas. Los

resultados mostraron un llamativo efecto de posición en los 32 brazos de los 16 cromosomas. Se demostró que mientras la mayoría de los genes reducían los niveles de transcripción en varias veces, los genes situados a menos de 100 kb del final de los cromosomas escapaban gradualmente a una parada de la transcripción. Estos resultados eran consistentes con la disipación de la tensión helicoidal al final de los cromosomas, indicando que las extremidades de los cromosomas de levaduras eran zonas topológicamente abiertas. El gradual escape de la parada de la transcripción observado a lo largo de los extremos de los cromosomas también señala que los límites topológicos cerrados son escasos en la cromatina de levaduras (Joshi, Pina et al. 2010).

A la vista de esos resultados que sugieren que las zonas terminales de los cromosomas de levaduras permiten la disipación de la tensión torsional se propone en el presente trabajo determinar las implicaciones de la conformación topológica durante la replicación y la segregación. Para ello, estudiamos el comportamiento de cromosomas circulares y lineales de *S. cerevisiae*, en la estirpe top2-td, durante las distintas fases del ciclo celular.

1.4.1 YACs (Yeast autonomous chromosome)

Los YACs son vectores que contienen los elementos mínimos de un cromosoma normal requeridos para su replicación y mantenimiento en células de levaduras. Deben contener un origen de replicación (ARS), un centrómero (CEN) y secuencias teloméricas (TEL). Poseen además un origen de replicación y una resistencia a antibiótico bacterianos para facilitar su amplificación en *E. coli* y marcadores de selección de levaduras para el crecimiento por auxotrofia.

1.4.1.1 ARS (autonomous replication sequence)

Los ARS son secuencias de ADN de unos cientos de pares de bases que permiten el mantenimiento de los plásmidos en cultivos de levaduras. Se encuentran en los 16 cromosomas de levaduras con una frecuencia media de uno cada 30-40 kb. Su

principal función es actuar como orígenes de replicación en su contexto cromosómico (Huberman, Zhu et al. 1988).

Inicialmente se propuso que la iniciación en eucariotas ocurría en sitios aleatorios, determinados únicamente por la disposición del ADN (Hand 1978; Sheinin and Humbert 1978). Un año más tarde, Davis y colaboradores, identificaron en *S. cerevisiae*, un segmento de ADN cromosómico que podía replicar sin integrarse en el genoma de la levadura (Struhl, Stinchcomb et al. 1979). Posteriormente, (Stinchcomb, Struhl et al. 1979) aislaron y caracterizaron el primer “replicador del cromosoma de levadura”, el ARS1. Se identificó por la capacidad de producir una alta frecuencia de transformación y mantenerse a través de generaciones. Bell y Stillman, años más tarde, definieron una secuencia consenso dentro del ARS (Bell and Stillman 1992) y análisis detallados del ARS1 (Tye 1999) y del ARS307 (Dubey, Kim et al. 1996) demostraron que poseían estructuras modulares.

Se definieron tres elementos esenciales, denominados dominios A, B y C, para el funcionamiento del ARS. El dominio A está constituido por una secuencia consenso de 11 pb [(A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)] conocida como ACS (*autonomous consensous sequence*). La parte central de la secuencia es esencial para la actividad del ARS y en este sentido pequeñas mutaciones o deleciones en la misma anulan su actividad (Chang, Theis et al. 2008). Un ARS eficiente puede contener entre 9 ó 10 pb de unión a esta secuencia. Al ACS se une el complejo de reconocimiento de orígenes (ORC), imprescindible para la iniciación de la replicación (Bell and Stillman 1992). El dominio B, es un elemento de 100 pares de bases en posición cis localizado por detrás del ACS, también esencial para la función del ARS (Theis and Newlon 1994). Las mutaciones dentro de este dominio reducen la facilidad del ADN para desenrollarse y la competencia de los orígenes de replicación (Dhar, Sehgal et al. 2012).

Por último el dominio C, se extiende aproximadamente 200 pb en la hebra 5' rica en T del ACS. Contiene sitios de unión a factores de transcripción, pero no es esencial para la actividad de los orígenes dentro de los elementos del ARS. Su importancia radica en su implicación en la formación de las burbujas de replicación (Celniker, Sweder et al. 1984). Sería necesaria una información más detallada sobre la

funcionalidad de este dominio para entender mejor los factores que promueven la iniciación y elongación de la replicación (Dhar, Sehgal et al. 2012).

1.4.1.2 Centrómeros

Los centrómeros son estructuras de los cromosomas eucariotas necesarias para la fijación al huso mitótico y para la segregación hacia los polos durante la mitosis y la meiosis. El ADN de levaduras está constituido mayoritariamente por secuencias únicas, incluso en los centrómeros, en contraste con los cromosomas eucariotas superiores, que contienen cantidades considerables de ADN repetitivo en las regiones centroméricas. Se han determinado las secuencias específicas de la mayoría de los centrómeros de *S. cerevisiae* que aunque presentan características estructurales comunes incluyen diferencias significativas (Clarke and Carbon 1985).

Una característica común en todos los centrómeros eucariotas es la presencia de un nucleosoma característico (Malik and Henikoff 2009). Los nucleosomas centroméricos se distinguen por la presencia de la histona cenH3 que reemplaza a la histona H3. En contraste a las H3 y H3.3 canónicas, que se encuentran entre las proteínas más conservadas, las histonas cenH3 divergen entre especies y están caracterizadas por colas distintivas N-terminal de variable longitud. Esto no implica diferencias funcionales a la hora de formación de los cinetocoros pudiendo remplazarse entre especies diferentes (Wieland, Orthaus et al. 2004). La incorporación de los nucleosomas cenH3 determina la identidad epigenética de los centrómeros.

Los plásmidos de *S. cerevisiae* que contienen un ARS presentan un alto número de copias (Fitzgerald-Hayes, Clarke et al. 1982) pero son mitóticamente inestables (Stinchcomb, Struhl et al. 1979) y se pierden con una alta frecuencia conforme la célula se divide. La presencia de una secuencia CEN funcional en plásmidos circulares con un ARS elimina la segregación parcial (Murray and Szostak 1983). Además, el número de copias de plásmidos ARS-CEN es sólo de una o dos por célula (Clarke and Carbon 1980) lo cual aumenta la estabilidad mitótica .

1.4.1.3 Telómeros

Los extremos de los cromosomas eucariotas están formados por complejas estructuras de proteínas y ADN llamadas telómeros. Estas estructuras previenen la degradación y la unión terminal con el final de los cromosomas y evitan la pérdida gradual de ADN asociado a la replicación de moléculas lineales. Se ha sugerido también que están involucrados en el posicionamiento nuclear del ADN cromosómico (Chung, Shea et al. 1990; Funabiki, Hagan et al. 1993; Palladino, Laroche et al. 1993).

La replicación telomérica se lleva a cabo mediante una transcriptasa reversa especial llamada telomerasa. Es una ribonucleoproteína cuya actividad depende del ARN y de componentes proteicos (Greider and Blackburn 1987). La telomerasa evita el problema asociado al final de la replicación de la hebra retardada utilizando un ARN como plantilla para la síntesis de ADN telomérico.

La telomerasa fue detectada por primera vez en preparados de extractos de células de *Tetrahymena thermophila* (Greider and Blackburn 1985). Su capacidad para extender una hebra de un oligonucleótido telomérico G en ausencia de un molde de ADN, sugirió que el ADN telomérico no funcionaba como una plantilla convencional. En levaduras, las secuencias características de telómeros se añadían al final de plásmidos lineales sólo si en el extremo de los mismos poseían al menos una corta secuencia telomérica (Pluta and Zakian 1989) (?).

La capacidad de los plásmidos lineales para mantenerse indefinidamente en *S. cerevisiae* se testó construyendo vectores lineales a los que se les unió *in vitro* regiones terminales de ADN ribosómico de *Tetrahymena thermophila* (Szostak and Blackburn 1982). El vector en su forma circular original portaba un ARS funcional siendo capaz de replicar autónomamente. Cuando se linearizó, se ligó un ADN ribosómico a cada extremo y se transformó en *S. cerevisiae*, se comprobó que replicaba como una molécula lineal, mientras que el vector sólo linearizado era inoperante. El mapeo de restricción y el análisis mediante hibridación demostraron que los fragmentos ligados eran similares en secuencia a telómeros de *S. cerevisiae* (Szostak and Blackburn 1982). La secuencia consistía en 300-500 pb de una secuencia irregular construida con

repeticiones en tándem de la secuencia C₁₋₃A (Blackburn 1984). Por lo tanto, se concluyó que los telómeros de *Tetrahymena* funcionaban como secuencias estables en levaduras y eran sustratos adecuados para la adición de secuencias teloméricas de levaduras (Shampay, Szostak et al. 1984).

1.5 Métodos de análisis del estado topológico del ADN

Uno de los primeros métodos de análisis de moléculas con diferentes formas topológicas fue la centrifugación en gradientes de densidad (Vinograd, Lebowitz et al. 1965). Este método fue años más tarde remplazado por la electroforesis en geles de agarosa, al ser un procedimiento que permitía diferenciar moléculas con diferentes complejidades en sí mismas, ya sean, superenrolladas, encadenadas y/o anudadas con distinto número de cruces (Sundin, 1981; Shishido, 1987; Shishido, 1989; Stasiak, 1996). Más adelante se utilizó la microscopía electrónica para el estudio de la topología de moléculas individuales (Krasnow, Stasiak et al. 1983; Sogo, Stahl et al. 1986; Sogo, Stasiak et al. 1999). En los últimos años se han obtenido imágenes de alta resolución de moléculas de ADN encadenado y anudado mediante microscopía de fuerza atómica, basada en el barrido de la superficie con una sonda o punta afilada que permite registrar la topología exacta de la muestra (Yamaguchi, Kubota et al. 2000; Lopez, Martinez-Robles et al. 2012).

La forma de la molécula de ADN influye en su movilidad electroforética. Por ello, entre las técnicas mencionadas, merece especial atención la electroforesis bidimensional como método preferencia que permite diferenciar moléculas con la misma masa pero con diferente conformación (Bell and Byers 1983).

1.5.1 Análisis de intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional

La influencia de la forma de la molécula de ADN en su movilidad electroforética queda en evidencia cuando se analizan ADN circulares en geles de agarosa. Los círculos superenrollados o niqueados no presentan la misma movilidad que las moléculas lineales de la misma masa. Las moléculas ramificadas de ADN migran de forma característica en geles de agarosa, y estas propiedades están fuertemente influenciadas por la concentración de agarosa y la fuerza del campo eléctrico. Basándose en estas propiedades, Bell y Byers (Bell and Byers 1983) desarrollaron el método de la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para separar moléculas lineales de moléculas ramificadas que se generan durante la replicación. La primera dimensión se produce bajo condiciones que minimizan el efecto de la forma molecular, en geles con baja concentración de agarosa y bajo voltaje, mientras que la segunda dimensión se realiza bajo condiciones que enfatizan el efecto de la forma, en geles de alta concentración de agarosa, alto voltaje y en presencia de un agente intercalante, normalmente bromuro de etidio (EthBr). En esas condiciones, se definieron moléculas lineales de ADN que habían migrado en el gel formando una curva, mientras que las moléculas ramificadas, cuya movilidad había disminuido de manera preferencial durante la electroforesis en la segunda dimensión aparecían por encima de dicha curva. Años más tarde Brewer y Fangman adaptaron este método para el análisis de intermediarios de replicación (Brewer and Fangman 1987).

Los fragmentos de restricción derivados del ADN en replicación dan lugar a tres formas básicas, dependiendo de los sitios de iniciación y terminación de la replicación (Figura 2). En el primer caso, el fragmento analizado es replicado pasivamente por una horquilla que entra por un extremo, la horquilla lo recorre en su totalidad y sale por el otro lado adquiriendo la forma de Y. A este patrón se le denomina arco de Y simple (Figura 2, en color verde). En la figura la señal 1,0x corresponde al fragmento de ADN lineal no replicado. El arco de Y simples parte de este punto y termina en el 2,0x, correspondiente a las moléculas completamente replicadas, situado también sobre el arco de lineales y cuya masa es el doble de la del fragmento no replicado. El punto de inflexión del arco de Y simples indica el sitio donde migran las moléculas que han sido

replicadas al 50%, es decir 1,5x veces de su masa. Estas moléculas son las más complejas, con tres brazos iguales en longitud, por lo que su movilidad en segunda dimensión es menor

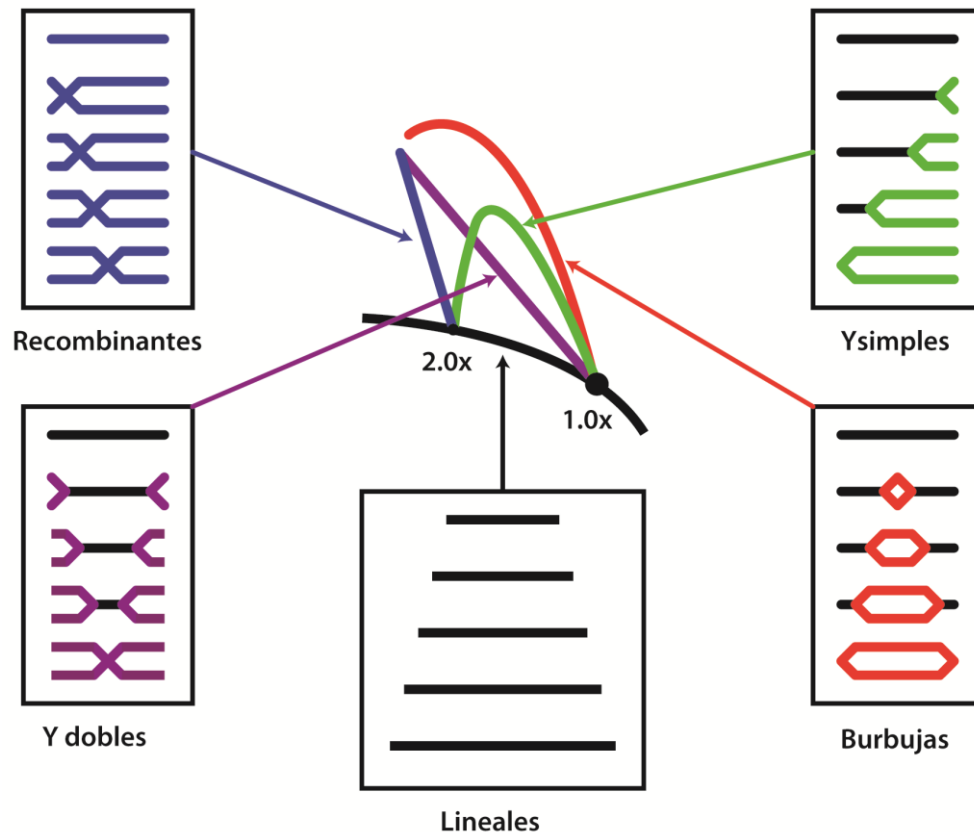


Figura 2. Ilustración de los patrones de hibridación generados por IsR lineales analizados por electroforesis bidimensional. Las moléculas lineales no replicadas de diferentes tamaños muestran en color negro. Las moléculas recombinantes no replicadas en forma de X se presentan en color azul. Los IsR con una burbuja interna se muestran en color rojo. Los IsR formados por dos horquillas convergentes se denominan Y dobles y se presentan en color morado. Finalmente los IsR generados por una única horquilla que se desplaza de un extremo a otro del fragmento se denominan Y simples y se representan en color verde.

En un segundo caso, la replicación del fragmento en estudio se realiza por dos horquillas que entran a la vez por los extremos y progresan a la misma velocidad y en direcciones opuestas, el encuentro de las mismas se produce en el centro del fragmento, obteniéndose la forma de una X. El patrón que se detecta en las autorradiografías se denomina arco de Y dobles (Figura 2, en color morado). Describe una línea recta que además del 1,0x, termina en el arco de recombinantes, cuyas características se detallan

más adelante. El punto de terminación en el arco de recombinantes dependerá del momento en que ambas horquillas de replicación convergen.

Por último, el patrón de burbujas se genera cuando el fragmento de estudio contiene un origen de replicación activo. Si la replicación es bidireccional y el origen se encuentra situado en el centro del fragmento, el movimiento de las horquillas hacia ambos lados genera intermediarios de replicación con una burbuja interna cuyo tamaño va aumentando conforme el fragmento es replicado. El patrón que se detecta en la inmunodetección es un arco de burbujas (Figura 2, en color rojo), el cual tiene un origen en el 1,0x y nunca regresa al arco de lineales, con una inflexión característica hacia el final de la curva. Esto se debe a que cuando la masa de los intermediarios de replicación con una burbuja interna se aproxima al 2,0x su estructura se hace menos compleja y adquiere una mayor movilidad electroforética. En el caso de que el origen no se encuentre en el centro, el patrón esperado es mixto, burbuja e Y simple y variará en función de la posición que ocupe.

Mediante geles bidimensionales podemos analizar además señales correspondiente a los intermediarios de recombinación. La señal correspondiente al arco de recombinantes (Figura 2, en color azul) se observa como una línea recta ligeramente inclinada que parte de la señal del 2,0x situada sobre el arco de lineales. Está constituida por moléculas con una masa 2,0x que presentan distinta movilidad electroforética durante la segunda dimensión en función del sitio donde se haya producido la recombinación. El intermediario recombinante más complejo es aquél en el que la recombinación se ha producido en el centro de los dos fragmentos recombinantes. Esta molécula está formada por cuatro brazos de igual longitud. El intermediario de recombinación que presenta más movilidad, es aquél en el que la recombinación ha tenido lugar en uno de los extremos de los dos fragmentos, migrando casi sobre el arco de lineales (Bell and Byers 1983).

La electroforesis bidimensional permite asimismo realizar el mapeo de orígenes de replicación (Brewer and Fangman 1987; Schvartzman, Adolph et al. 1990; Martin-Parras, Hernandez et al. 1991; Friedman and Brewer 1995), términos (Zhu, 1992 #584; Santamaría, 2000 #587; Santamaría, 2000 #586;) y de las barreras en el progreso de las

horquillas de replicación (Brewer and Fangman 1988; Hernandez, Martin-Parras et al. 1993; Wiesendanger, Lucchini et al. 1994). Por último, permite también resolver las distintas formas topológicas de moléculas covalentemente cerradas, CCCs (Schvartzman, Adolph et al. 1990; Martin-Parras, Hernandez et al. 1991; Hanai and Roca 1999), así como nudos (Martin-Parras, Lucas et al. 1998; Sogo, Stasiak et al. 1999; Olavarrieta, Martinez-Robles et al. 2002) y encadenados (Brewer and Fangman 1987; Lucas, Germe et al. 2001).

1.5.2 Estudio de la replicación durante la diferenciación en metazoos

Durante el desarrollo de un organismo multicelular, las células proliferan por un tiempo definido antes de comenzar su diferenciación. El proceso de diferenciación de células primitivas hacia células más especializadas implica una restricción en la capacidad de proliferación, culminando con la salida del ciclo celular. La precisa regulación de la división terminal celular es necesaria para asegurar la producción del número adecuado de células diferenciadas en el tiempo apropiado. El mantenimiento de la parada del ciclo celular en células en diferenciación terminal es importante para la función y arquitectura de los tejidos (Zhu and Skoultschi 2001).

El desarrollo y la diferenciación van normalmente asociados a cambios en los patrones de la replicación del ADN en eucariotas unicelulares y metazoos. En estos últimos, el desarrollo embriogénico requiere de cambios masivos en la expresión génica, a menudo acompañados por remodelaciones en la organización de la cromatina (Aladjem 2007). Como principal modelo de estudio de la diferenciación celular se han utilizado células eritroleucémicas MEL (*Murine Erythroleukemia cell Line*), que constituyen uno de los sistemas mejor caracterizados de reprogramación de células tumorales hacia una diferenciación y división celular terminal (Marks and Rifkind 1978).

1.5.3 Iniciación de la replicación en metazoos

Los orígenes de replicación cumplen dos importantes papeles: regular cuándo y dónde ocurre la iniciación de la replicación y asegurar un tiempo reproducible de finalización evitando la persistencia de ADN no replicado en mitosis, lo que supondría la inviabilidad de las células hijas (Laskey, 1985, Hyrien, 2003).

La replicación del ADN es un proceso altamente controlado que precisa de la duplicación del genoma completo una vez en cada ciclo celular. En *Escherichia coli*, un único origen de replicación es suficiente para replicar el genoma bacteriano al completo. Este sitio de iniciación se encuentra en un punto fijo dentro del genoma y está definido por una estricta secuencia genética (Jacob et al. 1963). En el eucariota unicelular *S. cerevisiae*, se activan múltiples orígenes de replicación específicos teniendo en común una secuencia consenso dentro de los ARS. Por otra parte, en *S. pombe*, los orígenes de replicación no tienen tal secuencia consenso y parecen estar relacionados con islas ricas en A-T (Dai, Chuang et al. 2005; Heichinger, Penkett et al. 2006) y con secuencias ricas en tramos de adenina y timina (Okuno, Satoh et al. 1999). En organismos multicelulares la iniciación de la replicación en zonas específicas del ADN está pobremente entendida. Los complejos de reconocimiento de orígenes (ORC) que se unen al ADN no son específicos de secuencia sugiriendo que la posición de los orígenes de replicación no es específica de una única secuencia (Vashee, Cvetic et al. 2003).

En células humanas y de ratón, se activan 30.000 y 50.000 orígenes de replicación en cada ciclo celular, respectivamente. En recientes estudios de análisis del genoma, se han mapeado algunos de estos orígenes observándose que están próximos a promotores de genes, regiones generalmente que contienen islas CpG (Cadoret, 2008 #612; Sequeira-Mendes et al. 2009). La ausencia de estrictas secuencias consenso que definan los orígenes de replicación en metazoos lleva a la pregunta de si mecanismos epigenéticos relacionados con la estructura de la cromatina y la transcripción podrían ser los principales determinantes en la localización de orígenes de replicación en eucariotas superiores (Gregoire, Brodolin et al. 2006).

1.5.4 La línea celular MEL como modelo de reprogramación *in vitro*

La línea celular MEL deriva de tumores de bazo de ratones infectados con el complejo vírico *Friend*, estableciéndose a partir de los mismos cultivos estables inmortalizados (Friend, Patuleia et al. 1966). Cuando se cultivaron estas células en un medio semisólido se comprobó que daban origen a células morfológicamente inmaduras, así como a eritroblastos nucleados en distintas etapas de maduración, lo que sugería la potencialidad inherente de las células MEL hacia la diferenciación eritroblástica (Singer, Cooper et al. 1974; Marks and Rifkind 1978).

En el proceso de la eritropoyesis un eritrocito maduro deriva de un progenitor multipotencial que se diferencia a BFU-E y CFU-E (unidades formadoras de brotes y colonias eritroides, respectivamente) y posteriormente a proeritroblastos. La principal citoquina implicada en la mitogénesis y diferenciación eritroide es la eritropoyetina (Epo). La diferenciación mediada por la Epo depende de la expresión del receptor de eritropoyetina (Epo-R), comenzando en el estadio más temprano, el BFU-E, y siendo receptor necesario a partir del estadio CFU-E.

1.5.4.1 El complejo vírico *Friend*

El complejo vírico *Friend* está formado por el SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) responsable de la proliferación celular pero defectivo en su propia replicación, y por el F-MuLV (*Friend Murine Leukemia Virus*) que aporta las funciones necesarias para la replicación del SFFV (Spiro, Gliniak et al. 1988). El blanco primario de la infección viral son los eritroblastos de tipo BFU-E y CFU-E. A diferencia de otros retrovirus, el SFFV no expresa una forma mutante de un gen huésped. En su lugar, codifica para una glicoproteína, gp55, capaz de unirse al receptor de eritropoyetina y activarlo de forma constitutiva (Ben-David, Giddens et al. 1990). Se ha demostrado que la gp55 necesita interaccionar además con una forma truncada del receptor STK (*stem-cell kinase receptor*) conocida como sf-STK (Zhang, Randall et al. 2006). Como consecuencia de la activación del receptor de eritropoyetina y del sf-STK se produce la expansión policlonal de los progenitores eritroides (Liao and Axelrad 1975; Peschle,

Migliaccio et al. 1980). En una segunda fase de la infección el SFFV se integra en el genoma de ratón. En más del 90% de las eritroleucemias inducidas por el complejo vírico *Friend* la integración del SFFV se produce en el locus del oncogen *Sfpi/PU.1* (Moreau-Gachelin, Tavitian et al. 1988). Se ha sugerido que la activación de PU.1, normalmente silenciado en el linaje eritroide, inducida por la integración del SFFV, es la responsable del bloqueo de la diferenciación (Rekhtman, Radparvar et al. 1999; Zhang, Zhang et al. 2000).

1.5.4.2 Inducción de la diferenciación de células MEL mediante HMBA

Las líneas celulares eritroleucémicas presentan características propias del estadio de proeritroblasto y pueden proliferar indefinidamente en cultivos *in vitro*. Sin embargo, bajo la acción de agentes inductores de la diferenciación, las células MEL son capaces de diferenciarse hasta un estadio equivalente al de normoblasto ortocromatofílico en ausencia de Epo (Marks and Rifkind 1978; Tsiftoglou and Robinson 1985; Rifkind 1986). El nivel de diferenciación espontánea en cultivo es normalmente menor del 1% pero pueden alcanzar más de un 90% de células diferenciadas después de varios días de tratamiento con un inductor.

Inicialmente las células tratadas con HMBA atraviesan un periodo de latencia (12-24 horas) denominado pre-determinación, caracterizado por una represión general de la expresión génica en donde eliminando el agente inductor las células vuelven al estado inicial indiferenciado. A partir de este momento, comienza la etapa de determinación en la que las células adquieren la capacidad irreversible de cesar la división celular y comienzan a mostrar características del estado diferenciado, aún en ausencia del agente inductor. A partir de las 72 horas de la inducción se observa un alto porcentaje de células que expresan marcadores eritropoyéticos y a las 120 horas más del 90% de las células ya están diferenciadas (Reuben, Wife et al. 1976; Marks and Rifkind 1978; Vanegas, García-Sacristán et al. 2003).

La inducción de la diferenciación de las células MEL va acompañada de numerosos cambios que son característicos de la diferenciación de células eritroides en

su entorno natural. Entre ellos destacan la inducción de expresión de marcadores α y β globinas, los grupos hemo, la anhidrina carbónica, los receptores de la espectrina y de la transferrina, entre otros. Se observan además cambios morfológicos característicos de la diferenciación eritroide: la relación de volumen entre citoplasma y núcleo decrece, la cromatina se condensa y el tamaño celular disminuye. Aunque en condiciones normales de cultivo las células no llegan a perder el núcleo, se ha demostrado que en presencia de fibronectina las células pueden llegar a hacerlo alcanzando la etapa de reticulocitos (Patel and Lodish 1987). La diferenciación culmina con el cese de la proliferación celular y la pérdida de tumorigenicidad.

1.5.4.3 Desbloqueo de la diferenciación en células MEL: parada de la proliferación celular

Durante el desarrollo normal de las células hematopoyéticas existe una relación inversa entre proliferación y diferenciación celular. Después del tratamiento con un agente inductor de la diferenciación como el HMBA, las células se dividen un máximo de 4 o 5 veces más, dejan de proliferar y se acumulan en la fase G1/G0 del ciclo celular (Friedman and Schildkraut 1977; Geller, Levenson et al. 1978). Estudios previos han puesto de manifiesto que la diferenciación de las células MEL va acompañada de cambios específicos en la expresión de factores relacionados con la regulación de la proliferación celular, tanto de reguladores positivos de la división celular cuyos niveles de expresión disminuyen, así como el aumento de la expresión de genes que codifican para inhibidores del ciclo celular (Lachman and Skoultchi 1984; Larsson, Pettersson et al. 1994).

Durante las últimas décadas se ha producido un significativo progreso en el entendimiento del control de la proliferación celular y la regulación de la iniciación y progresión de la síntesis de ADN. En contraste, la paulatina desaparición de la replicación conforme las células dejan de proliferar y se diferencian ha recibido poca atención. En la presente tesis se ha propuesto identificar los cambios que se producen durante la reprogramación de las células MEL hacia su diferenciación terminal a nivel de replicación, mediante el estudio de la progresión de las horquillas y la activación de

orígenes así como sus implicaciones en otros aspectos como la reorganización de la cromatina.

2 Objetivos

1. Analizar la movilidad electroforética de un minicromosoma circular de *S. cerevisiae* en geles bidimensionales para identificar los cambios topológicos que tienen lugar a lo largo del ciclo celular.
2. Caracterizar la implicación de la Top2 durante la segregación de las cromátidas hermanas en *S. cerevisiae*.
3. Construir cromosomas artificiales de levaduras (YACs) de pequeño tamaño con estructura circular y lineal.
4. Estudiar la iniciación, progresión y terminación de la replicación de minicromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae*.
5. Caracterizar la topología del ADN en minicromosomas circulares y lineales de *S. cerevisiae* y sus implicaciones durante la segregación.
6. Identificar los cambios que se producen en la dinámica de la replicación durante la reprogramación de las células MEL hacia su diferenciación terminal.
7. Determinar la asociación de estos cambios en la replicación con modificaciones epigenéticas relacionadas con la reorganización de la cromatina durante la diferenciación terminal.

3 Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Línea celular

MEL DS-19: (*Murine erythroleukemia cell line* (Mechali 2001) Línea celular cedida por el laboratorio del Dr. Arthur I. Skoultchi del Albert Einstein College of Medicine (Robin, Bollerot et al.). Deriva de una de las líneas originales establecidas por Charlotte Friend a partir de tumores subcutáneos de ratones infectados con el complejo vírico Friend (Friend, Patuleia et al. 1966; Marks and Rifkind 1978) formado por el SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) y el MuLV (*Murine Leukemia Virus*).

3.1.2 Condiciones de cultivo

La línea celular MEL DS-19 se mantuvo en medio de cultivo básico Eagle Modificado por Dubelco (DMEM) (Gibco) el cual se complementó con penicilina a una concentración de 100 U/ml (Life Technologies, Inc.) y estreptomicina a una concentración de 100 µg/ml (Life Technologies, Inc.), suero fetal bovino (PAA, laboratories GMBH) previamente inactivado a 65°C durante 30 minutos, a una concentración final de 10% (v/v). Las células se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda, en presencia de 5% de CO₂.

3.1.3 Ensayos de diferenciación

3.1.3.1 Tratamiento con HMBA

Las células MEL son líneas celulares immortalizadas capaces de recuperar el programa de diferenciación bajo la acción de un agente inductor, en este caso *N,N'*-Hexamethylene-bis-acetamide (HMBA), disuelto en agua estéril a una concentración

final de 5mM (Reuben, Wife et al. 1976). El tratamiento de diferenciación se llevó a cabo en cultivos celulares en crecimiento exponencial de $2,5 \times 10^5$ células/ml, recogiendo muestras a tiempo 0, 24, 48, 72 y 96 horas. La incubación se realizó en las mismas condiciones descritas para el mantenimiento de los cultivos celulares.

3.1.3.2 Ensayo de Benzidina

Las células diferenciadas se detectaron mediante ensayo de benzidina (Gusella, 1976; Marks, 1978). La benzidina reacciona con los grupos hemo de la hemoglobina produciendo una coloración azul en las células diferenciadas. Se mezclaron volúmenes iguales de una suspensión celular y de una solución 77.7 mM de dihidrocloruro de benzidina (Sigma) conteniendo 0,3% de peróxido de hidrógeno (MERCK). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer distinguiendo células teñidas (diferenciadas) de las no teñidas (proliferando). Para realizar preparaciones citológicas permanentes se recogieron 1×10^6 células a distintos tiempos de diferenciación en presencia de HMBA y se trataron con benzidina. Las células se centrifugaron 7 minutos a 700 rpm sobre portaobjetos utilizando una citocentrífuga (Cytospin 3 SHANDON). Se agregó una gota de medio de montaje EUKITT (Sigma), se colocó un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Las fotografías se tomaron con microscopio óptico Zeiss Axioplan con cámara digital Leica DFC 350 FX a intervalos de 24 horas durante los tiempos mencionados anteriormente.

3.1.4 Inducción de células MEL quiescentes

Se obtuvieron células quiescentes mediante la eliminación del suero fetal bovino del medio de cultivo durante 24 y 48 horas. Se confirmó la inducción de quiescencia en las células MEL mediante el estudio de la cinética de crecimiento contabilizando células en cámara de Neubauer en microscopio óptico.

3.2 Preparación de células para su análisis mediante citometría de flujo.

3.2.1 Análisis del ciclo celular mediante BrdU

Se incubaron 3×10^5 células/ml MEL tratadas con 5mM de HMBA a tiempos de 0, 24 y 48, con BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine, Sigma) 10 μ M durante 20 minutos a 37° C y 5% de CO₂. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm en centrífuga Beckmann. Se fijaron a una concentración final de 10^6 células/ml en etanol frío al 70%. Se mantuvieron a 4° C al menos 16 horas. Las células se permeabilizaron con 1 ml de solución de pepsina que contenía 200 μ g de pepsina (Sigma) en 2M HCl (Merck) a 37° C. Se lavó 3 veces con 10 ml de PBS 1x. Las células se resuspendieron en 0,3 ml de una solución de PBS con 0,5% Tween 20, 1% BSA, conteniendo 15 μ l de anti-BrdU FITC (Becton-Dickinson) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS conteniendo 20 μ g/ml de ioduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo (Coulter XL). Los datos fueron procesados y analizados con el software FlowJo 8.7.

3.3 Inmunohistoquímica.

Se fijaron 1×10^6 células MEL en etanol frío al 70% al menos 16 horas a 4°C. Las células se permeabilizaron en PBS-T 0,1% durante 30 minutos. Se bloqueó en PBS-T con 1% de BSA durante una hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-phospho-Histone H2A.X Ser139 (clone JBW301, Millipore) o Anti-HP1 α (clone 15, 19s2, Upstate, USA) a una dilución 1:500 (Krentz, Murphy et al. 2011) y 1:200 (Bartova, Pachernik et al. 2007) respectivamente en PBS-T BSA 1%. Se lavó tres veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario goat-anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes) a una dilución de 1:1000 y 1:400 respectivamente y con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, 0,2 μ g/ml, Sigma). De nuevo las células se lavaron tres veces con PBS, se centrifugaron sobre un portaobjetos a 700 rpm durante 7 minutos utilizando una citocentrífuga (Cytospin 3 SHANDON) y

se montaron con 20 μ l de ProLong Gold Antifade (Invitrogen). Se dejó secar al menos 2 horas a 4°C. Las imágenes se capturaron con el microscopio Leica TCS SP5 Confocal Laser equipado con un objetivo 63x de inmersión. Las fotografías fueron procesadas usando el *software* Adobe Phtoshop 4.0.

3.4 Análisis de fibras de ADN mediante la técnica ADN combing

La técnica *ADN combing* se basa en la individualización de fibras de ADN estiradas sobre un cubreobjetos previamente silanizado marcadas con nucleótidos análogos del ADN que sólo se incorporan al mismo durante la replicación. La inmunotinción nos permite la identificación de orígenes de replicación, así como el cálculo de la velocidad de progreso de las horquillas.

La técnica fue desarrollada originalmente por el grupo del Dr. Aaron Bensimon, del Instituto Pasteur de Paris (Bensimon, Simon et al. 1994) modificada más tarde por el grupo del Dr. Carl Schildkraut, del Albert Einstein Medical School de Nueva York (Norio and Schildkraut 2001) que la rebautizó como SMARD (*Single Molecule Analysis of Replicated DNA*).

3.4.1 Marcaje e inclusión en tacos de agarosa de bajo punto de fusión.

Se tomaron células MEL DS-19 en crecimiento exponencial, 5×10^5 cels/ml, las cuales se pulsaron con IdU (Sigma) a una concentración final de 40 μ M y consecutivamente con CldU (Sigma) a una concentración final de 400 μ M, durante 20 minutos respectivamente. Las células se resuspendieron a una concentración final de 4×10^6 cels/ml en PBS. Se mezcló a partes iguales con una solución al 1% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP, BioRad) obteniéndose una concentración final de 4×10^5 células por taco. Esta mezcla se introdujo en moldes de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* dejándose solidificar durante 30 minutos a 4° C. Seguidamente se digirió en 500 μ l de buffer ESP (10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA pH 8.0, 1% Sarcosyl, 2mg/ml

Proteínasa K) O/N a 50°C. A las 24 horas se cambió a buffer ESP fresco O/N a 50°C. Se lavaron los tacos durante 10 minutos en 0,5M EDTA pH 8.0 a 50°C. Se guardaron en una solución 0,5M EDTA pH 8.0 a 4°C.

3.4.2 Extracción de ADN genómico.

Los tacos se lavaron en tubos de 12 ml de fondo redondo con 7 ml de TE (10mM Tris HCl pH 8.0/ 1mM EDTA pH 8.0) durante 10 minutos. Se eliminó TE con mucho cuidado y se añadió 100 µl de TE y 1,5 µl de YoYo (Invitrogen). Se eligió un taco al azar de cada condición y se incubó en oscuridad y agitación durante 1 hora a 300 rpm. Se lavó 3 veces con 7 ml de TE 10 minutos cada vez. Se volvió a eliminar TE y se añadió 50mM MES pH 5.7 (Sigma). Cada taco se disolvió a 65° C en oscuridad y sin movimiento durante una hora, se equilibró a 45° C, se digirió con 3 µl de beta-agarasa (1u/1ul) (BioLabs) O/N y se incubó 10 minutos a 65° C. El extendido de las fibras se realizó sobre cubres silanizados mediante el método de silanización gaseosa cedidos por el Dr. Schwob, CNRS Montpellier durante 15 minutos. Las fibras de ADN se fijaron en horno a 60° C durante 2 horas. Y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con Super Glue 3. Se guardó a -20°C y en oscuridad.

3.4.3 Inmunodetección.

Las fibras de ADN se deshidrataron en baños sucesivos de etanol 70%, 90% y 100%, 3 minutos respectivamente. Seguidamente se desnaturalizó el ADN en una solución de NaOH 1M preparada en el momento durante 22 minutos. Se lavaron 5 veces 3 minutos cada una en PBS 1x para eliminar todo el NaOH. Se bloqueó en una solución de 1% BSA, PBS 1x y Triton (0.1% de 100x). Se secaron bien los portaobjetos y se añadió 18 µl de solución de anticuerpos primarios (1% BSA, PBS 1x y Triton 0.1%, 1/20 Anti-IdU (Mouse anti-BrdU clone B44, Becton Dickinson), 1/20 Anti-CldU (Rat anti BrdU clone BU1/75, AbCys SA) durante 45 minutos en cámara húmeda, oscuridad y a 37° C. Se lavaron 5 veces 3 minutos cada vez en PBST (PBS 1x, 0,1% Triton 100x). Se incubaron 30 minutos en cámara húmeda, oscuridad y a 37° C en 18 µl de solución

de anticuerpos secundarios (1% BSA, PBS 1x y Triton 0.1%, 1/50 Anti-Mouse (Goat anti-Mouse Alexa 546, Molecular Probes), 1/50 Anti-Rat (Goat Anti-Rat Alexa 488, Molecular Probes). Se lavaron 5 veces 3 minutos cada vez en PBST. Se incubaron 30 minutos en cámara húmeda, oscuridad y a 37° C en 18 µl de solución de anticuerpo primario 1/100 anti-ADN (Mouse anti ssADN (poly dT), Chemicon). Se lavaron 5 veces 3 minutos cada vez en PBST. Se incubaron 30 minutos en cámara húmeda, oscuridad y a 37° C en 18 µl de solución de anticuerpo secundario 1/50 anti-Mouse (Goat anti-Mouse IgG2a Alexa 647, Molecular Probes). Se lavaron 5 veces 3 minutos cada vez en PBST. Se añadió 20 µl de ProLong Gold (Invitrogen) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los portaobjetos se guardaron a 4° C y en oscuridad.

3.4.4 Adquisición de imágenes y análisis de datos.

Para la toma de imágenes se utilizaron dos microscopios diferentes: Leica DM6000B (Montpellier) equipado con cámara CoolSNAP HQ CCD con objetivo de 40x de inmersión en glicerol con *software* MetaMorph y microscopio Leica 6000 XL (Madrid) con cámara digital Leica DFC 350 FX, objetivo de 40x y *software* Leica.

El análisis de datos se hizo manualmente fibra por fibra midiendo la longitud de los diferentes segmentos marcados con *software* Photoshop y transfiriendo los datos a una tabla Excel para su organización. Su posterior análisis estadístico y la clasificación de los resultados se realizó con el programa GraphPrism 5.0.

3.5 Preparación y análisis de ARN.

3.5.1 Extracción y purificación de ARN.

Para aislar y purificar ARN total se utilizó el kit de extracción *Qiagen RNeasy Mini*, *Qiagen*. Se partió de 1×10^7 células por columna en todos los casos. Además se

realizó un tratamiento ADNsa (*RNase Free ADNse Set, Qiagen*) para evitar la contaminación con ADN.

3.5.2 RT-PCR.

Se sintetizó cADN de cadena sencilla a partir de 2 µg de ARN total de células MEL en presencia de HMBA durante 24 y 48 horas y en un cultivo tratado con 2 mM de hidroxurea (HU) (Sigma) durante 2 y 18 horas como control. Mediante la utilización de Oligo dT sintetizamos cADN procedente de mARN, el cual posee una cola de poly-A en el extremo 3' a la cual es capaz de unirse Oligo dT. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 µg de Oligo dT, 20 unidades de SUPERase In RNase Inhibitor (Ambion) y 200 unidades de SuperScript II Reverse Transcriptase. La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos y se inactivó a 70 °C durante 15 minutos.

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

La amplificación de cADN se realizó en el equipo iQ5 System (Bio-Rad). La mezcla de la reacción consistió en 1x SYBR Green Supermix (BioRad), 1 µl de cADN y 0,2 µM de cada oligonucleótido (Tabla I). Las condiciones de la PCR a tiempo real fueron 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla I y fueron sintetizados por Sigma.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para PCR a tiempo real

Nombre	Secuencia
Tubulina Fwd	TGAGACGTACAGCCCAAACCTC
Tubulina Rev	TGAATCCCATGTTCCAGACA
RRM1 Fwd	CCTGGTCTGGACGAGGTCT
RRM1 Rev	CGACCCTGCTTCTCGTAACT
RRM2 Fwd	TTTCTTTGCAGCGAGTGATG
RMM2 Rev	CGGGCCTCTGTAACTTGAAC

3.5.4 Análisis de la expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

El análisis de la expresión a partir de las Cts obtenidas en la PCR a tiempo real se realizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en el que se comparan directamente los Cts del gen de estudio y del gen de referencia (ΔC_t) en cada muestra, y posteriormente se compararon los ΔC_t de la muestra experimental con respecto a la muestra control. Para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares. Por ello, previo al análisis de muestras desconocidas se realizó una curva estándar para cada pareja de oligos. El análisis de los datos se realizó con el *software* iQ5 y Excel.

3.6 Material biológico y medios de cultivo

3.6.1 Material biológico

La estirpe de *E.coli* utilizada en este trabajo fue:

DH5 α F': [F' *endA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96* (nal^r) *relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)-U169 ϕ 80*dlacZ* Δ M15]

Las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en el estudio de la degradación de la Top2 así como su genotipo se detallan en la tabla II. Todas las estirpes derivan de W303-1a

(*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 can1-100*) adaptada para usarla con el degtron inducible por temperatura (Dohmen, Wu et al. 1994). La estirpe silvestre en todos los experimentos es YST114 (Tanaka and Diffley 2002; Baxter and Diffley 2008).

Tabla II. Estirpes *S. cerevisiae*

Estirpe	Genotipo
YST114	W303-1 <i>UBR1::pGAL-myc-UBR1 (HIS3) leu2::pCM244x3</i>
top2-td	YST114 <i>kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2</i>
cdc20-td	YST114 <i>kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-cdc20</i>
top2-td cdc20-td	YST114 <i>kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2</i> <i>kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-cdc2</i>
smc2-8 top2-td	YST114 <i>kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2 sms2-8 TRP1</i>

3.6.2 Medios y cultivo de *E.coli*

Los cultivos en medio líquido de la estirpe bacteriana utilizada se realizó en LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 1%, pH 7.5) a 37°C con agitación orbital de 250 rpm. Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina (Palladino, Laroche et al.) a 75µg/ml.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placa de Petri con medio LB al que se le añadió agar (Pronadisa) al 2%. Las placas se incubaron invertidas en estufa a 37°C de 16 a 18 horas.

3.6.3 Medios y cultivo de *S.cerevisiae*

El medio completo utilizado para crecer las estirpes sin transformar fue YPAR (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, adenina 60mg/ml, rafinosa 2%, pH5.6) autoclavado a 140°C. Las levaduras se crecieron en agitación orbital (250 rpm) y a 25°C.

Para la selección de la auxotrofia de las estirpes transformadas con los minicromosomas lineales o circulares, las levaduras se crecieron en medio SD CAA-TA URA⁻ (bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos 0,7%, mezcla completa de aminoácidos a excepción de uracilo, rafinosa 2%, pH 4,5).

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri con el medio correspondiente, al que se le añadió agar al 2%. Las placas se incubaron invertidas en 2 y 7 días a 25°C en estufa.

3.6.3.1 Sincronización de los cultivos de *S. cerevisiae*

La sincronización de los cultivos en crecimiento exponencial se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Linda Breeden (Breeden 1997) incluyendo algunas modificaciones.

Todas las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo son células haploides del tipo sexual a, por lo que responden normalmente a la feromona α -factor (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr) que provoca una parada en la fase G1 del ciclo celular.

Se creció la estirpe top2-td en medio selectivo SD CAA-TA URA⁻ 2% rafinosa para mantener la selección del minicromosoma, en agitación orbital a 250 rpm y 25°C hasta fase exponencial. Seguidamente las células se diluyeron en medio completo YPAR y se dejaron crecer hasta alcanzar fase exponencial (aproximadamente 1×10^7 células/ml). En este punto las células se pararon en G1 añadiendo al cultivo α -factor (síntesis en el CIB, química de proteínas) a una concentración final de 10 µg/ml. Tras 120 minutos de incubación se comprobó en el microscopio óptico que más del 90% de las células presentaban morfología *shmoo* característica del bloqueo en G1 provocado por α -factor. A continuación añadimos galactosa al 2% para expresar la Ubiquitina ligasa (UBR1, E3) que ubiquitinará a la Top2 fusionada con el degrón., y doxiciclina (Sigma) a una concentración final de 50 µg/ml, para reprimir el promotor del gen Top2. Seguidamente pasamos el cultivo a la temperatura restrictiva de 37°C durante 1 hora y

media para inducir el degrón de manera que la Top2 sea ubiquitinada y degradada por el proteosoma. Tras ese tiempo las células se liberaron del bloqueo lavándolas cuatro veces con medio de cultivo completo YPAR con galactosa y doxiciclina atemperado a 37°C. Se tomaron células (aproximadamente 1×10^9) por punto, recogiendo cada 20 minutos a lo largo de 120 minutos, tomando el tiempo 0 al final del primer lavado. Asimismo se recogieron alícuotas de 1 ml de cultivo para su posterior análisis por citometría de flujo.

Para el bloqueo con nocodazol (Sigma), un agente antimitótico que inhibe la polimerización de los microtúbulos, se dejó que las células replicaran su ADN en presencia de actividad de Top2 antes de que se bloquearan en metafase mediante el tratamiento con nocodazol. En primer lugar las células se sincronizaron con α -factor en medio YPAR a 25°C. Se liberaron del bloqueo en medio YPAR con galactosa y nocodazol a una concentración final de 10 μ g/ml. Tras 90 minutos de incubación a 25°C, se comprobó en el microscopio que las células presentaban morfología característica del bloqueo en mitosis causado por el nocodazol (>80% con gema). A continuación se añadió doxiciclina y pasamos el cultivo a temperatura restrictiva de 37°C durante 1 hora. Se lavó el nocodazol y se incubó de nuevo en medio YPAR con galactosa y doxiciclina a 37°C. Se recogieron alícuotas en los tiempos indicados anteriormente.

La estirpe con el doble degron, top2-td cdc20-td, se bloqueó en G1 con α -factor y tanto Cdc20 como Top2 fueron degradadas al pasar el cultivo a temperatura restrictiva. La degradación de Cdc20, proteína activadora del complejo promotor de anafase, APC, provocó el bloqueo de las células en metafase tardía. Las células se liberaron del bloqueo, progresando de manera sincrónica en el ciclo en presencia o ausencia de nocodazol.

3.7 Preparación de células de *S. cerevisiae* para su análisis mediante citometría de flujo

Las muestras se recogieron y procesaron siguiendo el protocolo de Labib y colaboradores (Labib, Diffley et al. 1999). Se analizaron en el citómetro XL Coulter y los datos se procesaron con el *software* FlowJo 8.7.

3.8 Construcción de minicromosomas y cromosomas circulares y lineales

Minicromosoma circular pRS316 (4891 pb): es un derivado de pRS306 (Ylp) al que se le han añadido la secuencia centromérica CEN6 y el origen de replicación ARSH4 (autonomous replication sequence) para su estabilidad mitótica en *S. cerevisiae* (Sikorski and Hieter 1989). En el sitio NdeI posee un inserto de 1112 pb que contiene el gen URA3 (Figura 3).

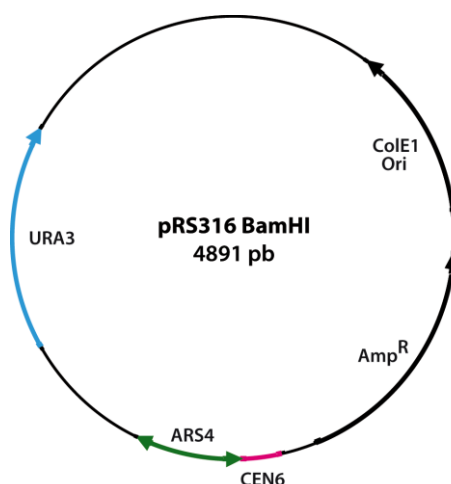


Figura 3. Mapa genómico del minicromosoma pRS316. Esquema representativo del minicromosoma pRS316 en el que se detallan los elementos más importantes que lo componen.

Minicromosoma circular pRSMEM (4788 pb): es un derivado del minicromosoma pRS316 (Figura 1). En primer lugar se añadió dos secuencias del fago Lambda de 273 y 463 pb, sonda $\lambda 1$ y sonda $\lambda 2$, clonadas respectivamente entre los sitios Sal I y KpnI para ser utilizadas con sondas. La sonda $\lambda 1$ se obtuvo mediante digestión enzimática del ADN del fago Lambda con la enzima SalI y se extrajo y se purificó de gel de agarosa con *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen. La sonda $\lambda 2$ se obtuvo por

PCR con oligonucleótidos a los que se les añadió colas con el corte de la enzima KpnI protegido por un triplete de Cs.

KpnI Fwd: CCCGGTACCAAAGCCAGAACTCCCCGTAT

KpnI Rev: CCCGGTACCACCGTGACACCGGATATGTT

El producto de PCR se purificó con *QIAquick PCR Purification kit* de Qiagen. En ambas ligaciones el vector se desfosforiló en el extremo 5' mediante la fosfatasa alcalina SAP (Palladino, Laroche et al.). Las reacciones de ligación se realizaron con una relación molar vector:inserto de 1:3 en presencia de 10 unidades T4 ADN ligasa (Palladino, Laroche et al.). Después de 16 horas de incubación a 4°C se transformó con la totalidad de la reacción.

Por último eliminamos el origen F1 y el gen LacZ mediante digestión enzimática con la enzima NsiI y purificación en gel de agarosa. Se ligó los extremos del vector a baja concentración en un volumen de 20 µl para favorecer la ligación intramolecular. Después de 16 horas de incubación a 4°C se transformó con la totalidad de la reacción (Figura 4).

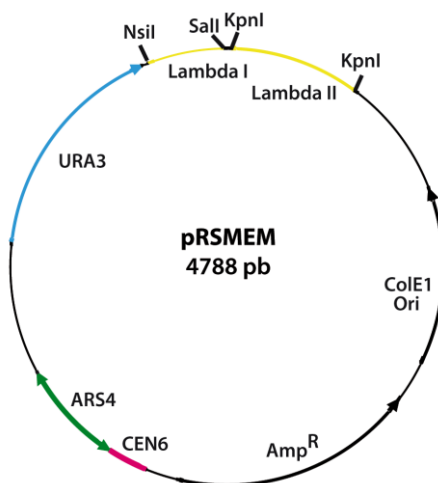
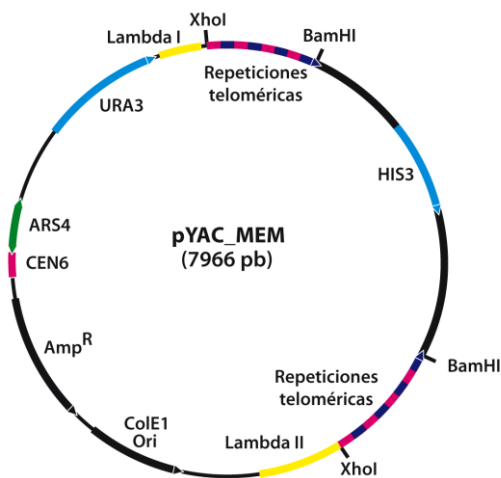


Figura 4. Mapa genómico del minicromosoma pRSMEM. Esquema representativo del minicromosoma pRS316 en el que se detallan los elementos más importantes que lo componen así como las enzimas de restricción más relevantes.

Cromosoma circular pYAC_MEM (7966 pb): es un derivado del minicromosoma pRSMEM (Figura 2), al que en el sitio único XhoI se clonó un



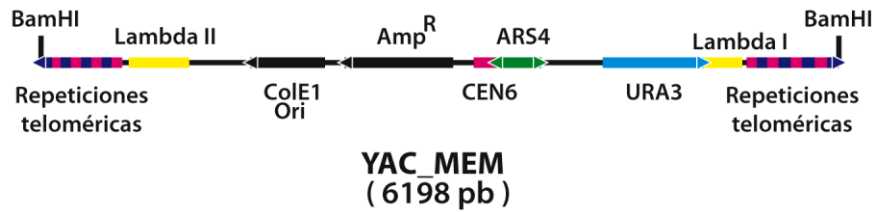


Figura 6. Mapa genómico del cromosoma lineal YAC_MEM. Esquema representativo del cromosoma YAC_MEM en el que se detallan los elementos más importantes que lo componen así como las enzimas de restricción más relevantes.

3.9 Transformación de *E. coli*

La preparación de células *E. coli* competentes y su posterior transformación se realizó según el método de cloruro de rubidio y choque térmico descrito por Hanahan (Hanahan, 1986).

3.10 Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de células de *S. cerevisiae* se realizó según el método de acetato de litio descrito por Ausubel y colaboradores (Ausubel, 1995) y Martín-Parras y colaboradores (Martín-Parras, Lucas et al. 1998).

3.11 Preparación de ADN

3.11.1 Extracción de ADN de *E. coli*

3.11.1.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

La extracción a pequeña escala de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó mediante *el Nucleo Spin Plasmid kit* de Macherey-Nagel. Para la extracción a gran escala empleamos *JETstar Plasmid Purification MAXI kit* de Genome.

3.11.1.2 Extracción de ADN total a partir de colonias

En una placa de Petri con 20 ml LB-agar, con el antibiótico adecuado para la estirpe transformada, se estriaron colonias individuales hasta un total de 40 colonias por placa. La mitad de cada estría se resuspendió en 40 µl de solución de lisis (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, NaOH 100 mM, SDS 1%). Tras agitar en vortex se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 3 µl de HCl 1N y 5 µl de tampón de carga para electroforesis. Tras incubar 20 minutos en baño a 80 °C, los tubos se pasaron a un baño de hielo-agua y se centrifugó a 14.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se cargó directamente en un gel de agarosa al 0,6%. De esta forma se pudo analizar de forma rápida una gran cantidad de colonias. Esta técnica se utilizó en procesos de selección de bacterias recombinantes en los que había una diferencia de más de 500 pb en el vector y el plásmido recombinante. Una vez seleccionadas las colonias positivas, se analizaron mediante digestiones enzimáticas.

3.11.2 Extracción de ADN de *S. cerevisiae*

3.11.2.1 Extracción de ADN total

Para la extracción rápida de DNA total de las distintas estirpes de *S. cerevisiae* y su posterior análisis por *Southern Blot* se utilizó el método desarrollado por Hoffman (Hoffman and Winston 1987) y colaboradores introduciendo algunas modificaciones.

Se recogieron por centrifugación, a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, de 10-20 ml de un cultivo saturado ($1,5 \times 10^8$ células/ml). Se lavó con 0,5 ml de agua destilada estéril y volvió a centrifugar. Seguidamente, se resuspendió en 200 μ l de tampón de rotura (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM pH 8.0) y se añadió PCIA 25:24:1 y 0,3 g de esferas de vidrio (425-600 micras de diámetro, Sigma). La mezcla se agitó en vortex a máxima velocidad durante 2 minutos a 4°C. A continuación, se mezcló la emulsión con 200 μ l de TEN₁₀₀ (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0) y se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente en una microcentrífuga de mesa. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadió otros 200 μ l de tampón de rotura. Se volvió a repetir todo el proceso, a excepción de que no se añadió TEN₁₀₀. Se mezclaron las fases acuosas y se desproteinizó tres veces con un volumen igual de PCIA 25:24:1 y una vez con un volumen de CIA 24:1 para luego precipitarlo con 1 ml de etanol frío al 100%. Se centrifugó a 14.500 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril durante, al menos 18 horas a 4°C. El volumen correspondiente a 5×10^9 células fue digerido con enzimas de restricción para su análisis por *Southern*.

3.11.2.2 Extracción de formas replicativas

El protocolo utilizado para la extracción de formas replicativas de ADN total está basado en el descrito por Huberman y colaboradores en 1987 (Huberman, 1987) con algunas modificaciones.

Los cultivos de las estirpes a estudiar se crecieron hasta una concentración de 1×10^9 células/ml y se detuvieron con ázida sódica al 0,1%. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril fría centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A continuación las células se resuspendieron en solución de NIB frío (*Nuclear Isolation Buffer*; glicerol 17%, MOPS 50 mM, acetato de potasio 150mM, cloruro de magnesio 2mM, espermidina 500 μ M y espermina 150 μ M, pH 7,2). La rotura mecánica de la pared celular se realizó en cámara fría añadiendo a las células en suspensión un volumen igual de esferas de vidrio (425-555 micras de diámetro) alternando periodos de 30 segundos en vortex a máxima velocidad y de reposo en hielo. Una vez comprobada la rotura de la pared celular mediante microscopio óptico de alrededor del 90% de las células, se dejaron depositar las esferas en el fondo del tubo por gravedad y se recogió el sobrenadante con los protoplastos. Las esferas de vidrio se lavaron 2 veces más con dos volúmenes de NIB frío. Estos lavados se juntaron al sobrenadante original y los protoplastos se recogieron por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se lisaron las células incubándolas durante 1 hora a 37°C en 500 μ l de TEN₅₀₋₅₀₋₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH8.0) conteniendo Sarkosyl NL-30 (Sigma) al 1,5% y proteinasa K (Palladino, Laroche et al.) a 300 μ g/ml. Después de la incubación se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Para la eliminación de las proteínas se trató con un volumen de PCIA 25:24:1 varias veces hasta ver desaparecer la interfase y una vez con CIA 24:1. El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 100% frío durante al menos 16 horas a -20°C. Se centrifugó a 9000 rpm durante 1 hora a 4°C. Se lavó con etanol 70% frío y se centrifugó en las mismas condiciones pero durante 30 minutos. Finalmente se dejó secar al pellet y se resuspendió a una concentración final de 3×10^7 células/ μ l en agua destilada estéril durante, al menos, 16 horas a 4°C.

3.12 Digestiones enzimáticas

3.12.1 Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de doble cadena

Digestiones totales con la enzimas de restricción Bam HI, XhoI, KpnI, SalI, PvuI, PvuII y SmaI se llevaron a cabo durante al menos 3 horas a 37 °C, a excepción de SmaI cuya temperatura de acción fue a 25 °C.

3.12.2 Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de cadena sencilla

Digestiones totales de las formas replicativas de ADN de los minicromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae* se llevaron a cabo con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla Nt.Bpu10I durante 1 hora a 37 °C; mientras que el tratamiento parcial se realizó en las mismas condiciones pero durante 15 minutos.

3.13 Análisis de ADN

3.13.1 Electroforesis en geles de agarosa

3.13.1.1 Electroforesis unidimensional

El análisis de ADN por electroforesis unidimensional se realizó en geles de agarosa de Pronadisa a distintas concentraciones dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN analizadas y utilizando como tampón TBE 1x o TAE 1x. Como marcador de peso molecular se utilizó el bacteriófago lambda digerido con HindIII o la escalera de Mass Ruler de alto y bajo peso molecular, según convenga en cada caso. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (Sigma) a una concentración de 1µg/ml y se visualizaron en transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda.

3.13.1.2 Electroforesis bidimensional neutra-neutra

El análisis del ADN por electroforesis bidimensional en geles de agarosa se realizó siguiendo el protocolo descrito originariamente por Brewer y Fangman (Brewer and Fangman 1988) ligeramente modificado de acuerdo al tamaño de las moléculas según se trate de formas intactas o digeridas.

3.13.1.3 Electroforesis bidimensional de formas intactas

Las condiciones de primera dimensión de baja concentración de agarosa y bajo voltaje permiten separar moléculas de ADN fundamentalmente en función de su tamaño. Para analizar los minirosomas circulares de pequeño tamaño (en torno a las 4-5Kb), la primera dimensión se desarrolló en geles a una concentración de 0,4% de agarosa y se corrió a 0,9 V/cm durante 25-30 horas. Para analizar minirosomas lineales y circulares de pequeño tamaño (entre 6,5-8 Kb) se utilizó una concentración de 0,35% de agarosa y se corrió al mismo voltaje durante 35 horas. Las condiciones de segunda dimensión de alta concentración de agarosa y alto voltaje permiten separar las moléculas de ADN fundamentalmente en función de su forma. Ésta se desarrolló en geles de agarosa de 0,9-1% y se corrió a 5 V/cm durante 10-14 horas.

Para analizar el tipo y el nivel de superenrollamiento de las moléculas con distintas formas topológicas se utilizó cloroquina (Sigma) como agente intercalante durante la primera y/o segunda dimensión. Las concentraciones de cloroquina utilizadas, tanto en el gel de agarosa como en el tampón de TBE 1x de la cubeta de electroforesis fueron de 0,1 a 20 µg/ml.

3.13.1.4 Electroforesis bidimensional de formas digeridas

Para fragmentos de un tamaño comprendido entre 4-6 Kb en primera dimensión se utilizaron geles a una concentración de 0,4% de agarosa y se corrieron a 0,9V/cm durante 24-26 horas a temperatura ambiente. En segunda dimensión los geles, a una

concentración de 0,9 %, se corrieron a 5V/cm durante 8-10 horas a 4°C en presencia de 0,3 µg/ml de EtBr.

En el caso de fragmentos de ADN de tamaños inferiores a 4 Kb, la primera dimensión se realizó en geles a una concentración de 0,45% de agarosa y se corrieron a 0,9V/cm durante 24-26 horas a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó en geles a una concentración de 1,1% y se corrieron a 5V/cm de 5-7 horas a 4°C en presencia de 0,3 µg/ml de EtBr.

Para fragmentos de ADN de tamaños mayores a 5 Kb, la primera dimensión se realizó en geles al 0,35% de agarosa y se corrieron a 0,9V/cm durante 30-40 horas a temperatura ambiente. La segunda dimensión, en geles de agarosa al 1% y a 5V/cm de 10-12 horas a 4°C en presencia de 0,3 µg/ml de EtBr.

3.13.2 Transferencia del ADN a soportes sólidos

Los geles de agarosa se transfirieron a membranas de nailon (Zeta Probe GT Blotting Membranes, BioRad) según el método de *Southern* (Southern 1975) y de acuerdo al protocolo de transferencia alcalina descrito por López-Estraño y colaboradores (Lopez-estrano, Schvartzman et al. 1998)

3.13.3 Marcaje e hibridación de ácidos nucleicos

3.13.3.1 Marcaje de sondas no radiactivas

Las sondas de ADN (300 ng de ADN) se marcaron con digoxigenina mediante el kit de marcaje no radiactivo *DIG-High-Prime* de Roche, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

3.13.3.2 Hibridación de ácidos nucleicos con sondas no radicativas

Las membranas de nailon se incubaron en botellas cilíndricas, durante 4-6 horas a 65°C, en 20 ml de una solución de SSPE 2x (NaCl 360 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 20 mM y EDTA 2 mM pH 8.0), leche descremada 0,5%, sulfato de dextrano 10%, SDS 1% y ADN esperma de salmón 0,5 mg/ml, sonificado y desnaturalizado. Para la hibridación la sonda desnaturalizada se añadió a una concentración de 25ng/ml y se incubaron en botellas durante 16 horas a 65 °C. Transcurrido ese tiempo las membranas se lavaron sucesivamente con SSC 2x / SDS 0,1%, SSC 0,1x / SDS 0,1%, dos veces cada uno en tiempo de 5 y 15 minutos respectivamente (los dos últimos precalentados a 68 °C). Finalmente se realizó la detección con anticuerpo conjugado (Anti-Digoxigenin-AP de Roche) y sustrato quimioluminiscente (CDP-Star, PerkinElmer) según el protocolo descrito por la casa comercial.

3.13.4 Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (Secugen) empleando un secuenciador automático ABI PRISM 3700 ADN Analyzer de Applied Biosystems.

4 Resultados

4.1 Estudio de moléculas encadenadas en *S. cerevisiae*.

Para estudiar los posibles cambios en la topología del ADN durante las distintas fases del ciclo celular en *S. cerevisiae* en presencia y en ausencia de Top2, se utilizó una estirpe de levaduras inducible y deficiente en esta topoisomerasa: top2-td degrón, (Baxter and Diffley 2008) con el fin de comprobar el efecto de esta enzima sobre la población de moléculas encadenadas. Se transformaron células de esta estirpe de levaduras con el minicromosoma circular pRS316 que contiene el origen de replicación ARS4 y la secuencia de ADN centromérica CEN6. Las dos moléculas hermanas de pRS316 que resultan de su replicación *in vivo* se desencadenan rápidamente al terminar la replicación en presencia de niveles normales de Top2. Para resolver las distintas familias de moléculas encadenadas se decidió utilizar la electroforesis bidimensional en geles de agarosa de alta resolución.

4.1.1 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma en presencia y en ausencia de Top2

Partiendo de cultivos exponenciales de células silvestres y de la estirpe top2-td crecidas a 25°C, se bloquearon las células en fase G1 con α -factor y se liberaron del bloqueo de manera sincrónica, recogiendo muestras a intervalos regulares de 20 minutos. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en presencia de IP, como se muestra en la Figura 7A. En el perfil de ciclo de las células silvestres, localizadas a la izquierda de la figura, se observó que después de la liberación del bloqueo en G1 el contenido en ADN siguió una dinámica normal. En contraposición, el perfil de la estirpe deficiente en Top2, a la derecha de la Figura 7A, sufrió un retraso a los 60 minutos y un posterior aumento del contenido en ADN equivalente a la fase G2. Algunas células llegaron incluso a alcanzar un contenido de 4C a las 120 horas. Las pocas células que consiguieron entrar en el siguiente G1 lo hicieron de manera aberrante, con un contenido por debajo de 1C, indicando que la segregación cromosómica no fue correcta.

Tomando como referencia los perfiles del ciclo celular de las células silvestres se pudo definir la duración de las diferentes fases del ciclo celular. La fase S o fase de replicación del ADN se prolongaría durante los primeros 40 minutos produciéndose la mitosis en torno a los 60-80 minutos después de la liberación del bloqueo de la fase G1.

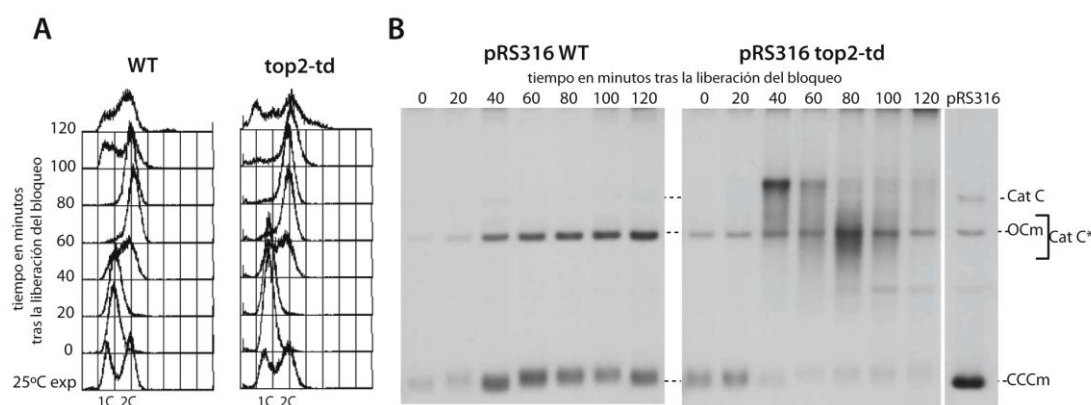


Figura 7. Caracterización del ciclo de división en células de la estirpe top2-td de *degron*. Células silvestres y de la estirpe top2-td se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica, se recogieron y analizaron muestras cada 20 minutos. **A.** Análisis del contenido en ADN por citometría de flujo mediante IP de las muestras obtenidas desde la fase de crecimiento exponencial a 25°C, pasando por el bloqueo en G1 con α -factor y la liberación del bloqueo a 37°C. **B.** Estudio de la topología del minicromosoma pRS316 en la estirpe top2-td por electroforesis unidimensional en geles de agarosa. En la inmunodetección se observa la movilidad electroforética de las formas monoméricas, CCCs y OCs y de los encadenados Cat Cs. El corchete a la derecha de la fotografía indica la transición de Cat C a Cat C*. Como control se utilizó el minicromosoma pRS316 aislado de células de *E. coli*.

En la Figura 7B se observa la movilidad electroforética de pRS316, aislado de las células analizadas por citometría de flujo, en un gel unidimensional. La inmunodetección de la izquierda corresponde a células de la estirpe silvestre en la que se observaron las formas monoméricas correspondientes al minicromosoma. En cambio, en la inmunodetección de la derecha, correspondiente a la estirpe deficiente en Top2, apareció una acumulación de formas encadenadas, Cat Cs, a los 40 minutos. A partir de este momento se apreció un cambio significativo hacia una forma topológica con mayor movilidad electroforética hasta los 80 min, a la que se denominó Cat C*. Teniendo en cuenta los tiempos calculados para cada fase del ciclo celular y los tiempos de aparición de los encadenados se designó como Cat C a los encadenados premitóticos y Cat C* a la forma mitótica de los mismos en torno a los 60-80 minutos. La última muestra a la

derecha, corresponde al minicromosoma pRS316 extraído de *E. coli* utilizado como identificador de las formas monoméricas CCC y OC.

Estos resultados indican la presencia de un tipo de encadenados, los Cat C*, desconocidos hasta el momento. Estos encadenados tienen modificadas algunas de sus propiedades topológicas, apareciendo en el gel en una posición diferente.

4.1.1.1 Estudio de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la fase S del ciclo celular.

A la vista de los resultados obtenidos en el gel unidimensional de la Figura 1B se decidió utilizar la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para analizar con mayor precisión las diferentes formas topológicas que pueden adoptar los encadenados durante la replicación en ausencia de Top2. Tomando como referencia los tiempos observados en el análisis de la citometría de flujo de la Figura 7A, se dedujo que la fase S transcurrió aproximadamente entre los 20 y 40 minutos después de la eliminación del bloqueo.

Células de la estirpe top2-td transformadas con pRS316 se crecieron hasta la fase exponencial, se sincronizaron con α -factor y la proteína Top2 fue degradada. Las células sincronizadas se liberaron del bloqueo y se recogieron después de 20, 25, 30, 35 y 40 minutos. Se extrajeron las formas replicativas que fueron analizadas por electroforesis bidimensional.

En la Figura 8A se presentan las inmunodetecciones correspondientes a los tiempos de recogida citados anteriormente donde se apreció, aunque de forma casi imperceptible en el caso de los primeros tiempos, 20 y 25 min, la señal correspondiente a los Cat Cs que se hizo más evidente en la muestra de 30 minutos, al mismo tiempo que aparecieron señales correspondientes a Cat Bs y Cat As. En los tiempos de 35 y 40 minutos se mantuvieron las mismas señales de encadenados ya observadas a los 30 minutos.

Para confirmar la naturaleza de las formas topológicas observadas se trataron las muestras con una endonucleasa de restricción de cadena sencilla, *Nt.BpU10I*, que corta una sola vez en el minicromosoma. El tratamiento con endonucleasas de este tipo elimina todo el superenrollamiento presente en las moléculas, ya que provoca roturas de cadena sencilla en la doble hélice de ADN. El efecto se muestra en la Figura 8B, en la que se puede comprobar la conversión de los Cat Cs y Cat Bs a Cat As, que forman un arco por encima de la señal correspondiente a las OCs. En este arco se visualizaron distintos topoisómeros dependiendo del número de encadenamientos que contenían, ya que su movilidad electroforética es proporcional al número de cruces intermoleculares existentes (Martin-Parras, Lucas et al. 1998). Se pudo contabilizar en torno a 20 encadenamientos, situándose la moda entre 8 y 15. La desaparición total de la señal correspondiente a las formas CCC monoméricas y su conversión a formas relajadas, OCs, permitió corroborar la acción de la endonucleasa sobre los encadenados Cat Cs y Bs.

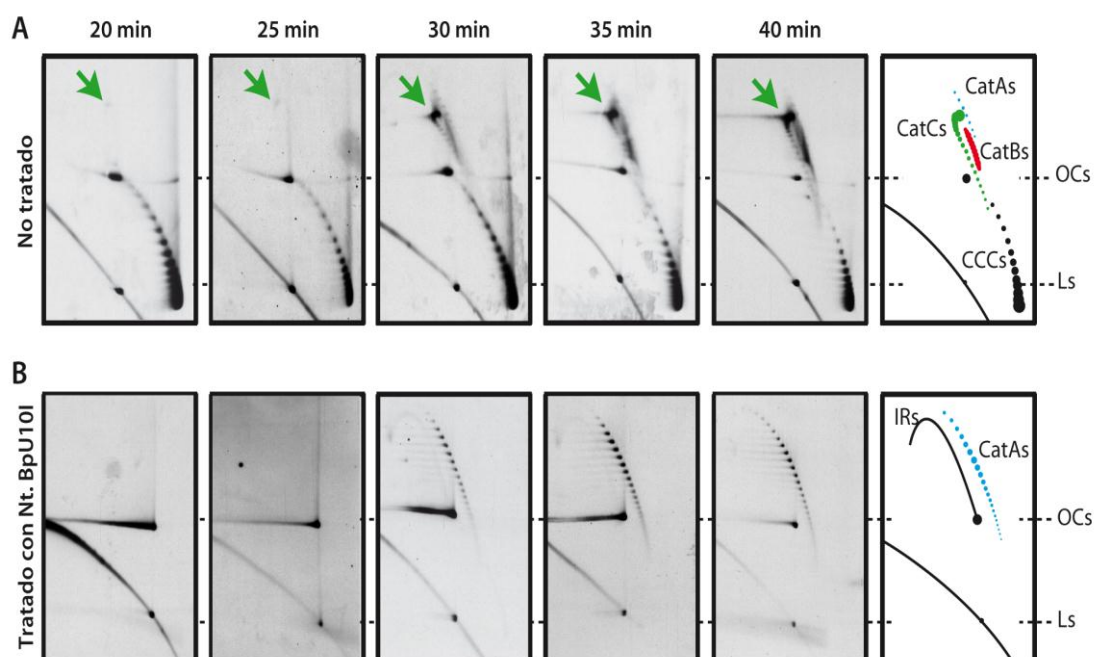


Figura 8. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en ausencia de Top2 durante la fase S del ciclo celular. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en la fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica, se recogieron muestras desde 20 hasta 40 minutos a intervalos regulares de 5 minutos. **A.** Immunodetecciones del minicromosoma pRS316 en las muestras intactas de 20, 25, 30, 35 y 40 minutos. **B.** Immunodetecciones del minicromosoma en las muestras de 20, 25, 30, 35 y 40 minutos tratadas con 100 unidades de la endonucleasa de cadena sencilla *Nt. BpU10I* durante 4 horas a 37°C. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra un esquema representativo. En color negro se

indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

4.1.1.2 Estudio de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la fase S del ciclo celular en presencia de diferentes concentraciones de cloroquina.

En el experimento anterior se pudo comprobar que la señal de los Cat Cs aparecía de manera súbita al final de la replicación. Se quiso averiguar el tipo de superenrollamiento que albergaban estos encadenados. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones de cloroquina sólo durante la segunda dimensión de las electroforesis bidimensionales.

La cloroquina es un agente intercalante de la doble hélice de ADN que provoca un desenrollamiento parcial de la molécula en el sitio en el que se intercala. En el caso de plásmidos circulares con un superenrollamiento (-) nativo, la incorporación de cantidades crecientes de cloroquina consiguen relajar las moléculas que incluso pueden llegar a adquirir superenrollamiento (+) (Bauer and Vinograd 1968). En la Figura 3, se muestran ejemplos del efecto de la cloroquina sobre el comportamiento electroforético de las formas superenrolladas, cuando la droga se añade en primera, en segunda o en ambas dimensiones de un gel bidimensional.

Si sólo se añade cloroquina en la primera dimensión, el efecto de la misma se diluye en la segunda dimensión, por lo que la movilidad electroforética de las moléculas en la segunda dimensión vuelve a ser la correspondiente a su estado inicial, pero teniendo en cuenta el efecto provocado por la cloroquina en la primera dimensión (Figura 9B). En este caso se apreció una alta resolución de los encadenados de izquierda a derecha, afectando principalmente a los Cat Bs, los cuales se resolvieron mejor en primera dimensión respecto al control (Figura 9A), pero sin variar apenas su movilidad electroforética en segunda dimensión. En los monómeros covalentemente cerrados, CCCs, especies que aparecen en la imagen por debajo de las OCs, fue donde mejor se apreció este efecto. Los monómeros que se encontraban inicialmente relajados adquirieron mayor movilidad electroforética en primera dimensión debido a la

adquisición de superenrollamiento (+), migrando en segunda dimensión a la misma altura que las OCs al recuperar su estado topológico inicial. A partir de su localización en la imagen, en el punto más alto de la serie, a la derecha de las OCs, se diferenciaron monómeros con superenrollamiento (+) hacia la izquierda y (-) hacia la derecha.

En el caso de mantener la misma concentración de cloroquina en primera y segunda dimensión (Figura 9C), el efecto provocado en primera dimensión se mantiene en segunda dimensión. Las especies con una misma masa pero con diferente superenrollamiento presentaron la misma movilidad electroforética, migrando en la misma posición. Este efecto se apreció tanto en los encadenados como en los monómeros dando la sensación de una imagen más compacta y de menor resolución.

En la Figura 9D se muestra el último supuesto en el que la concentración de cloroquina en segunda dimensión fue mayor que en primera. Las formas topológicas se resolvieron mejor en segunda dimensión migrando a diferentes alturas dependiendo del tipo de superenrollamiento. Además, al correr la primera dimensión en presencia de cloroquina, se sumaron los efectos de resolución en segunda dimensión, tanto de izquierda a derecha como de arriba abajo.

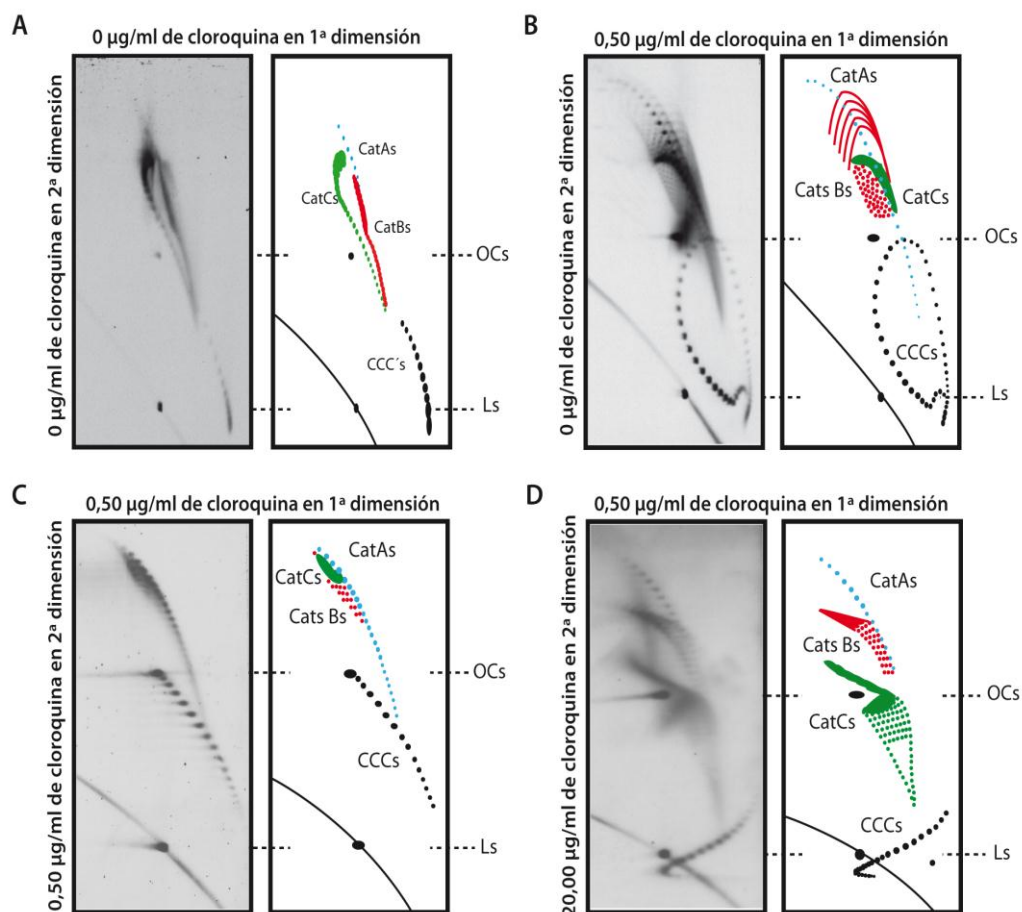


Figura 9. Efecto de la cloroquina sobre la movilidad electroforética de las formas topológicas en la electroforesis bidimensional. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. Las electroforesis bidimensionales se realizaron en presencia de distintas cantidades de cloroquina. **A.** Inmunodetección del minicromosoma pRS316 en ausencia de cloroquina. **B.** Inmunodetección del minicromosoma en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera dimensión. **C.** Inmunodetección del minicromosoma en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera y segunda dimensión. **D.** Inmunodetección del minicromosoma en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera y 20,00 $\mu\text{g/ml}$ en segunda dimensión. A la derecha de cada imagen se muestra el esquema representativo, en color negro se muestran las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

En los tres ejemplos se apreció que los encadenados de tipo A, mostraron la misma movilidad electroforética en todos los casos, al igual que las OCs, al tratarse de moléculas con roturas de cadena sencilla.

A la vista de los diferentes efectos que produce la cloroquina en las distintas dimensiones, se decidió realizar las electroforesis bidimensionales en presencia de diferentes concentraciones de cloroquina en primera y segunda dimensión. Se eligió el

tiempo de 40 minutos como el más representativo de la fase S y se analizó la población en presencia de concentraciones crecientes de cloroquina desde 0,10 $\mu\text{g/ml}$ hasta 10,00 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 10 se muestran las inmunodetecciones obtenidas, partiendo de una muestra intacta para observar la movilidad electroforética inicial de los Cat Cs y poder compararla con las que presentan las muestras expuestas a diferentes concentraciones de cloroquina. Bajas concentraciones de cloroquina, de 0,10 a 0,75 $\mu\text{g/ml}$, correspondientes a los 4 paneles superiores después del control sin cloroquina, no fueron capaces de movilizar significativamente la población de Cat Cs. En la imagen correspondiente a 1,00 $\mu\text{g/ml}$, segunda inmunodetección de la segunda fila, se apreció una disminución de la movilidad con respecto al control. A partir de esta concentración hasta 10,00 $\mu\text{g/ml}$ la movilidad de los Cat Cs fue muy parecida.

Centrándonos en las formas CCCs monoméricas, desde la concentración de 0,10 $\mu\text{g/ml}$ se apreció una disminución en la movilidad electroforética hacia el estado relajado. La concentración de 0,75 $\mu\text{g/ml}$ consiguió movilizar las CCCs a la misma altura de las formas relajadas, OCs. A partir de esta concentración las CCCs adquirieron superenrollamiento (+), aumentando de nuevo su movilidad electroforética en segunda dimensión hasta la última concentración analizada, 10,00 $\mu\text{g/ml}$, en la que recuperaron su localización inicial.

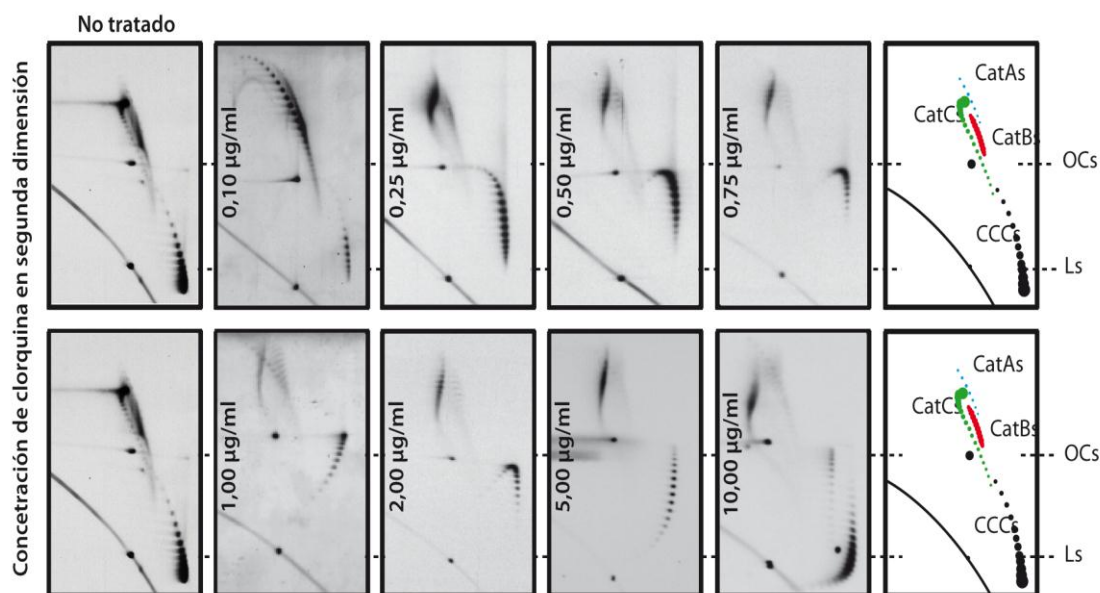


Figura 10. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en ausencia de Top2 durante la fase S del ciclo celular en presencia de cloroquina en segunda dimensión. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron muestras a los 40 minutos. Se muestran las inmunodetecciones del minicromosoma pRS316 en presencia de distintas concentraciones de cloroquina en segunda dimensión desde 0,10 $\mu\text{g/ml}$ hasta 10,00 $\mu\text{g/ml}$. A la derecha de cada fila de imágenes se muestra el esquema representativo de la muestra control, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

Después de ensayar con ocho concentraciones diferentes de cloroquina no se pudo llegar a ningún resultado concluyente respecto a los cambios de la movilidad electroforética de los Cat Cs. Las formas monoméricas, por el contrario, mostraron cambios de su movilidad coherentes dentro de la serie de cloroquina analizada.

A la vista de los resultados obtenidos se quiso comprobar si comparando la movilidad de los Cat Cs a diferentes tiempos dentro de la fase S del ciclo celular: 30, 35 y 40 minutos, en presencia de dos concentraciones diferentes de cloroquina en segunda dimensión se podía detectar alguna diferencia en la movilidad electroforética y de ello deducir el tipo de superenrollamiento que albergaban inicialmente.

Tomando como referencia los monómeros de la Figura 10, se eligieron las concentraciones de 1,00 $\mu\text{g/ml}$, que conseguía relajar totalmente la población, y 5,00 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina, en la que las CCCs ya adquirirían superenrollamiento positivo.

En la Figura 11 se observa que ninguna de las dos concentraciones de cloroquina en los tres tiempos estudiados consiguieron provocar el efecto deseado en la movilidad electroforética de los Cat Cs, como se apreció en el caso de las formas monoméricas.

Definitivamente, el estudio del cambio de la movilidad electroforética de los encadenados en presencia de concentraciones crecientes de cloroquina en segunda dimensión no permitió llegar a ninguna conclusión sobre el tipo de superenrollamiento que albergan estas especies durante la fase S del ciclo celular.

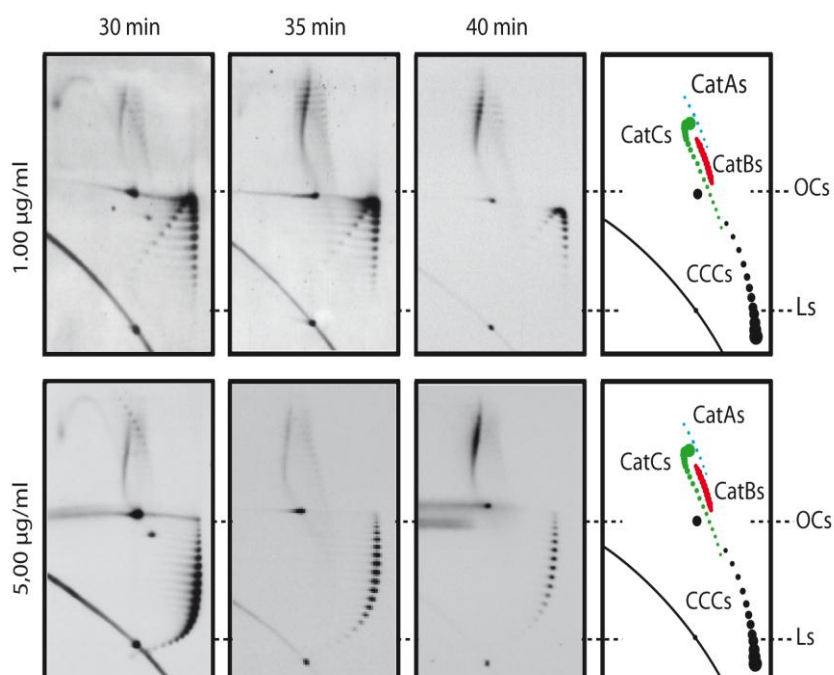


Figura 11. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en ausencia de Top2 durante la fase S del ciclo celular en presencia de dos concentraciones de cloroquina en segunda dimensión. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron muestras a los tiempos de 30, 35 y 40 minutos. Se muestran las inmunodetecciones del minicromosoma pRS316 a diferentes tiempos en presencia de concentraciones de cloroquina sólo en segunda dimensión de 1,00 $\mu\text{g/ml}$ y 5,00 $\mu\text{g/ml}$. A la derecha de las imágenes se muestra un esquema representativo de la muestra control, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

4.1.1.3 Estudio de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la mitosis.

Se quiso comprobar entonces los cambios observados en la movilidad electroforética de los encadenados, tal y como se había apreciado en el gel unidimensional de la Figura 1B. A partir de los tiempos designados por la citometría de flujo en la estirpe silvestre para la mitosis (Figura 7A), se analizó la movilidad electroforética de los encadenados a los 80 minutos en geles bidimensionales en ausencia de Top2.

En la muestra intacta (Figura 12A) se observan los mismos encadenados acumulados que aparecen en la muestra de 40 minutos (Figura 8A), con una mayor acumulación de Cat Cs y Bs. Se confirmaron en la muestra tratada con la endonucleasa *Nt. BpU10I* (Figura 12B), al convertirlos en Cat As. Se pudieron contabilizar en torno a 20 topoisómeros y la moda se situó entre 8 y 15 encadenados, al igual que en la muestra de 40 minutos (Figura 8B).

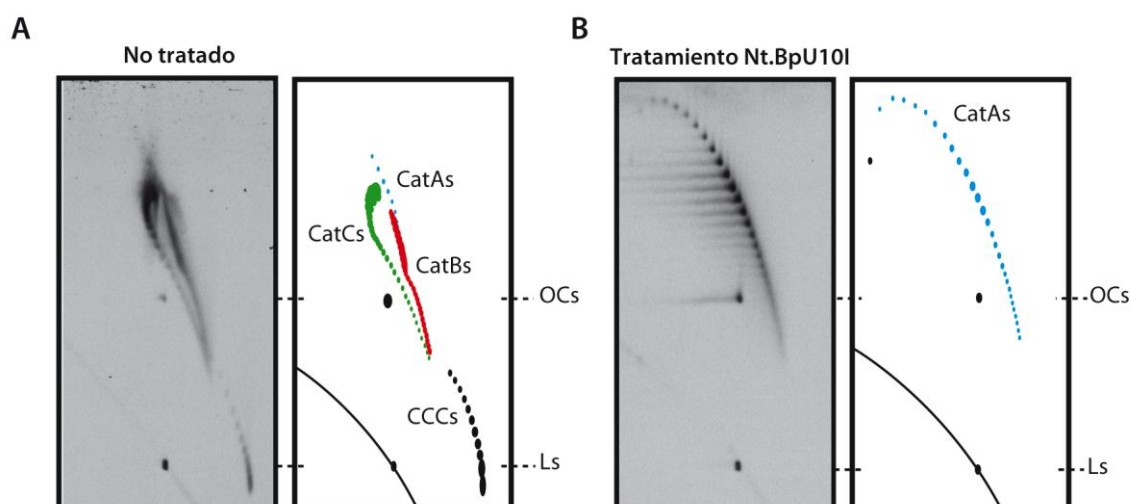


Figura 12. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en ausencia de Top2 durante la mitosis. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. **A.** Immunodetección del minicromosoma pRS316 en la muestra intacta de 80 minutos. **B.** Immunodetección del minicromosoma en la muestra de 80 minutos tratada con 100 unidades de la endonucleasa de cadena sencilla *Nt. BpU10I* durante 4 horas a 37°C. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra un esquema representativo, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

La acumulación de encadenados en mitosis indica la imposibilidad del minicromosoma para segregar correctamente en ausencia de Top2. No se apreciaron

cambios significativos en la movilidad y apariencia de los Cat Cs a los 80 minutos con respecto a los observados a los 40 minutos, tal y como se observó inicialmente en el gel unidimensional.

4.1.2 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados en la estirpe con el doble degrón pRS316 top2-td cdc20-td durante el ciclo celular.

Los encadenados acumulados en mitosis no mostraron diferente movilidad ni apariencia respecto a los observados durante la fase S. Para identificar las causas de la transición de Cat C a Cat C* se desarrolló una nueva estirpe, top2-td cdc20-td, en la que unida al degrón de la Top2 se añadió la mutación del complejo activador Cdc20. La eliminación del complejo activador de anafase Cdc20 hace que las células queden bloqueadas en metafase. Además se utilizó un tratamiento con nocodazol, que impide la formación del huso mitótico al interrumpir la polimerización de los microtúbulos.

Se partió de un cultivo exponencial de células top2-td cdc20-td transformada con pRS316 crecido a 25°C, se bloqueó en fase G1 con α -factor y tanto la proteína Top2 como el complejo cdc20 fueron degradados. Las células se liberaron de manera sincrónica en el ciclo celular en presencia y en ausencia de nocodazol. Se recogieron muestras a intervalos regulares de 20 minutos y se analizaron por citometría de flujo en presencia de IP.

El estudio de los perfiles de ciclo de ambos tratamientos, en ausencia y presencia de nocodazol se muestran en la Figura 13A, de izquierda a derecha respectivamente. La velocidad de entrada en ciclo después del bloqueo en G1 fue más rápida en la estirpe libre de nocodazol, aunque en ambos casos estaba ralentizada comparada con la estirpe top2-td (Figura 7A). Los perfiles de ciclo se equilibraron a los 80 minutos, quedando atrapadas las células en la fase G2/M, siendo incapaces de entrar de nuevo en ciclo, al quedar bloqueadas justo antes de mitosis.

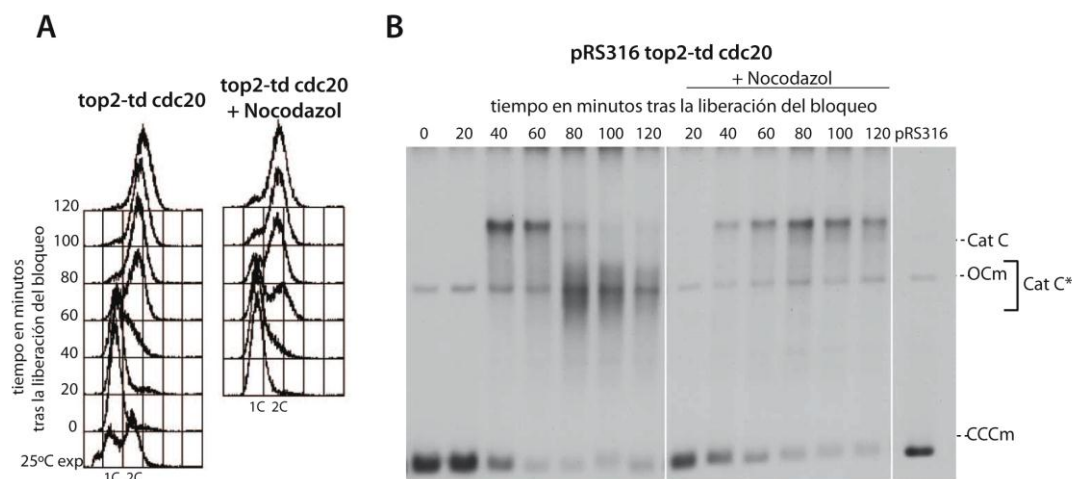


Figura 13. Caracterización de la estirpe con la doble mutación de grón top2-td y cdc20-td. Células de la estirpe top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica en presencia y en ausencia de nocodazol, se recogieron y analizaron muestras cada 20 minutos. **A.** Análisis del contenido en ADN por citometría de flujo mediante IP de las muestras obtenidas desde fase exponencial a 25°C, pasando por el bloqueo en G1 y la liberación en el ciclo celular a 37°C. **B.** Estudio de la topología del minicromosoma pRS316 en la estirpe top2-td cdc20-td mediante electroforesis unidimensional. En la inmunodetección se muestra la movilidad electroforética de las formas monoméricas, CCCs y OCs y de los encadenados Cat Cs. Mediante un corchete se indica la transición de Cat Cs a Cat C*. Como control para identificar las diferentes formas topológicas se utilizó el minicromosoma pRS316 aislado de *E. coli* analizado en las mismas condiciones.

En el estudio de la movilidad electroforética del minicromosoma en gel unidimensional (Figura 13B) se observó la transición de Cat C a Cat C* de pRS316 en las células top2-td cdc20-td a los 80 y 100 minutos, localizadas en el lado izquierdo de la inmunodetección. En contraposición a la muestra tratada con nocodazol, que no presentó esta transición, ya que sólo se acumularon Cat Cs manteniéndose constantes a lo largo del tiempo. La última muestra representada en el gel unidimensional, localizada a la derecha del mismo, corresponde al minicromosoma pRS316 extraído de *E. coli* utilizado como identificador de las formas topológicas monoméricas.

Los resultados obtenidos sugieren que la aparición de los Cat C* tuvo lugar antes del comienzo de la anafase. Los microtúbulos mitóticos fueron necesarios para su formación ya que en su ausencia, debido al tratamiento con nocodazol, no se observó la transición de Cat C a Cat C*.

4.1.2.1 Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la mitosis en las estirpes top2-td y top2-td cdc-20 en presencia y en ausencia de nocodazol.

En el gel unidimensional de la Figura 13B se demostró que las células crecidas en presencia de nocodazol están enriquecidas en Cat Cs mientras que las crecidas en ausencia del mismo lo están en Cat C*. Se quiso averiguar si la topología de los encadenados del minicromosoma era responsable de su distinta movilidad electroforética.

Se estudiaron muestras de 80 minutos obtenidas de células sincronizadas en G1 con α -factor y liberadas del bloqueo en presencia y en ausencia de nocodazol siempre en ausencia de Top2.

Cuando se compararon las inmunodetecciones de la Figura 7 se observó un ligero aumento de la movilidad electroforética de los Cat Cs y Bs de la muestra bloqueada en anafase por la degradación del complejo Cdc-20, correspondiente a la imagen del apartado C con respecto a la muestra control (apartado A) y a la muestra tratada con nocodazol (apartado B).

La resolución de la electroforesis bidimensional no permitió averiguar el diferente estado topológico entre muestras enriquecidas en Cat C y Cat C*. Aunque la muestra bloqueada en anafase presentó variación en la movilidad electroforética de los encadenados, tanto Cat Bs como Cat Cs, no fue suficiente para llegar a obtener un resultado concluyente.

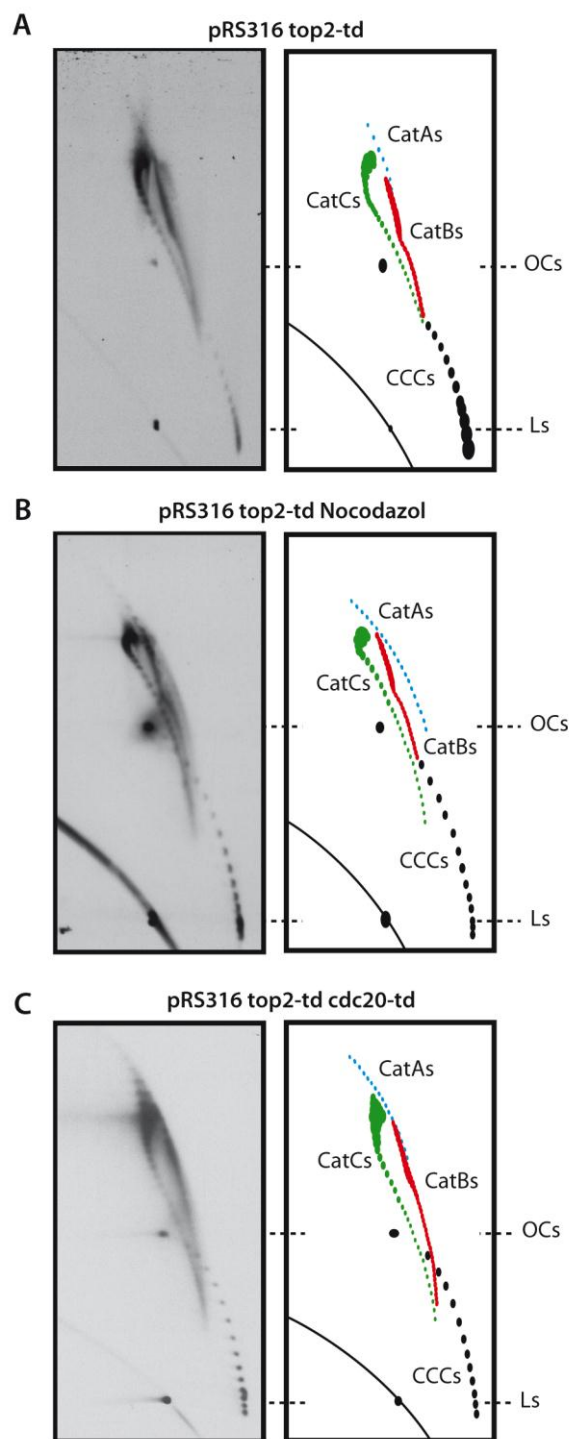


Figura 14. Diferente movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en presencia y ausencia de microtúbulos mitóticos. Células de la estirpe top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. **A.** Inmunodetección del minicromosoma pRS316 en la muestra crecida en ausencia de Top2 exclusivamente. **B.** Inmunodetección del minicromosoma en la muestra enriquecida en Cat C en la estirpe top2-td cdc20-td crecida en presencia de nocodazol. **C.** Inmunodetección del minicromosoma en la muestra enriquecida en Cat C* en la estirpe top2-td cdc20-td. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra un esquema representativo, en color negro se observan las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

4.1.2.2 Estudio de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la mitosis en presencia y ausencia de nocodazol con diferentes concentraciones de cloroquina.

Las formas Cat C y Cat C* presentan movilidades electroforéticas diferentes debidas a su distinto grado de superenrollamiento. Para profundizar en esta cuestión, se añadió cloroquina en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional para intentar distinguir la naturaleza del superenrollamiento inicial de cada muestra. Se eligieron dos concentraciones de cloroquina en función de la movilidad electroforética observada en los monómeros de la serie utilizada para el análisis de la fase S del ciclo celular (Figura 10) que fueron 1,00 y 20,00 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Esta última fue elegida como la concentración a la que las CCCs eran capaces de regresar a su posición inicial recuperando su movilidad electroforética original.

En la Figura 15 se muestra el estudio del minicromosoma en la muestra de 80 minutos crecida en ausencia de Top2 y Cdc20 y en presencia de nocodazol, por lo que la muestra estaba enriquecida en Cat Cs. Cuando comparamos la movilidad de los Cat Cs en presencia de 1,00 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en segunda dimensión (Figura 9B) frente al control sin intercalante (Figura 15A) se observó un aumento de la movilidad electroforética de los mismos en presencia de cloroquina llegando a migrar los Cat Cs por debajo de las OCs. El mismo efecto se apreció en los monómeros, CCCs, que alcanzaron el estado relajado, al disminuir su movilidad electroforética en segunda dimensión hasta una altura igual a la de las OCs. En la muestra de 20,00 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15C), los Cat Cs recuperaron su movilidad electroforética original migrando prácticamente a la misma altura que los Cat Cs en la muestra sin intercalante. Lo mismo ocurrió con las CCCs.

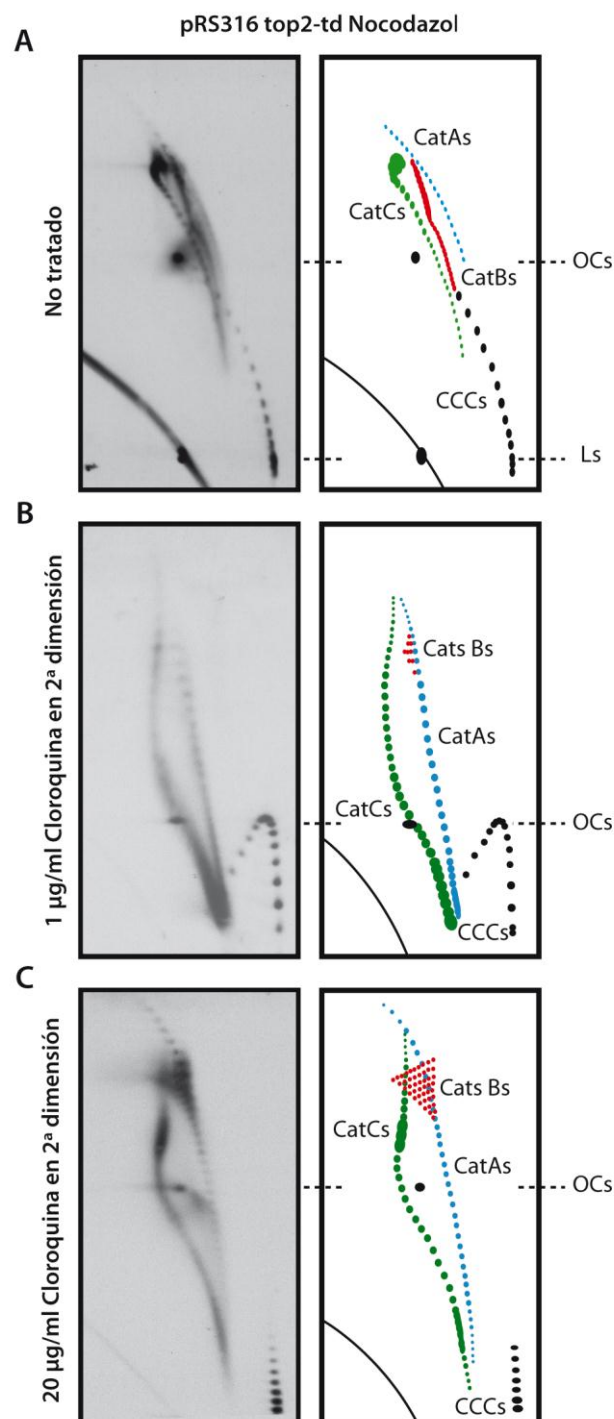


Figura 15. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 tratado con nocodazol durante la mitosis en presencia de cloroquina. Células de la estirpe top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica en presencia de nocodazol y se recogieron a los 80 minutos. **A.** Inmunodetección de la muestra en ausencia de cloroquina. **B.** Inmunodetección de la muestra en presencia de 1,00 µg/ml de cloroquina en segunda dimensión. **C.** Inmunodetección de la muestra en presencia de 20,00 µg/ml de cloroquina en segunda dimensión. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra un esquema representativo, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

En la Figura 16 se muestra el análisis del minicromosoma pRS316 recogido a los 80 minutos en células crecidas sin nocodazol y en ausencia de Top2 y Cdc20, por lo tanto enriquecidas en Cat C*. Cuando confrontamos la movilidad de los Cat Cs de la inmunodetección en presencia de 1,00 µg/ml de cloroquina en segunda dimensión (Figura 16B) frente a la imagen obtenida en el control sin intercalante (Figura 16A) se observó un aumento de la movilidad electroforética de los Cat Cs hasta la altura de las OCs. En las moléculas no replicadas se observó la pérdida de movilidad de las CCCs que migraron a la altura de las OCs e incluso volviéndola a adquirir en algunos casos. En contraposición a la muestra de 20,00 µg/ml que presentó una movilidad electroforética de los Cat Cs muy parecida a la que poseía en la muestra control sin intercalante. Las CCCs recuperaron su movilidad en presencia 20,00 µg/ml.

Cuando comparamos la movilidad electroforética de la muestra enriquecida en Cat Cs (Figura 15B) frente a la de los Cat Cs* (Figura 16B), en presencia de 1,00 µg/ml cloroquina en segunda dimensión se observó una mayor movilidad electroforética de los Cat Cs. En cambio, en el caso de 20,00 µg/ml de cloroquina, las movilidades electroforéticas de los Cat Cs (Figura 15C) y los Cat Cs* (Figura 16C) fueron muy parecidas, recuperando en ambos casos su movilidad inicial.

Los efectos observados en la migración de los encadenados con las concentraciones de cloroquina utilizadas en segunda dimensión no proporcionaron información suficientemente relevante para llegar a una conclusión definitiva respecto a la existencia de diferencias topológicas entre Cat C y Cat C*. Se planteó entonces utilizar una baja concentración de cloroquina únicamente en primera dimensión. En el transcurso de la segunda dimensión las moléculas recuperan la movilidad electroforética que tenían en ausencia del intercalante mejorando su resolución en el gel como ya se ha señalado en la Figura 9B.

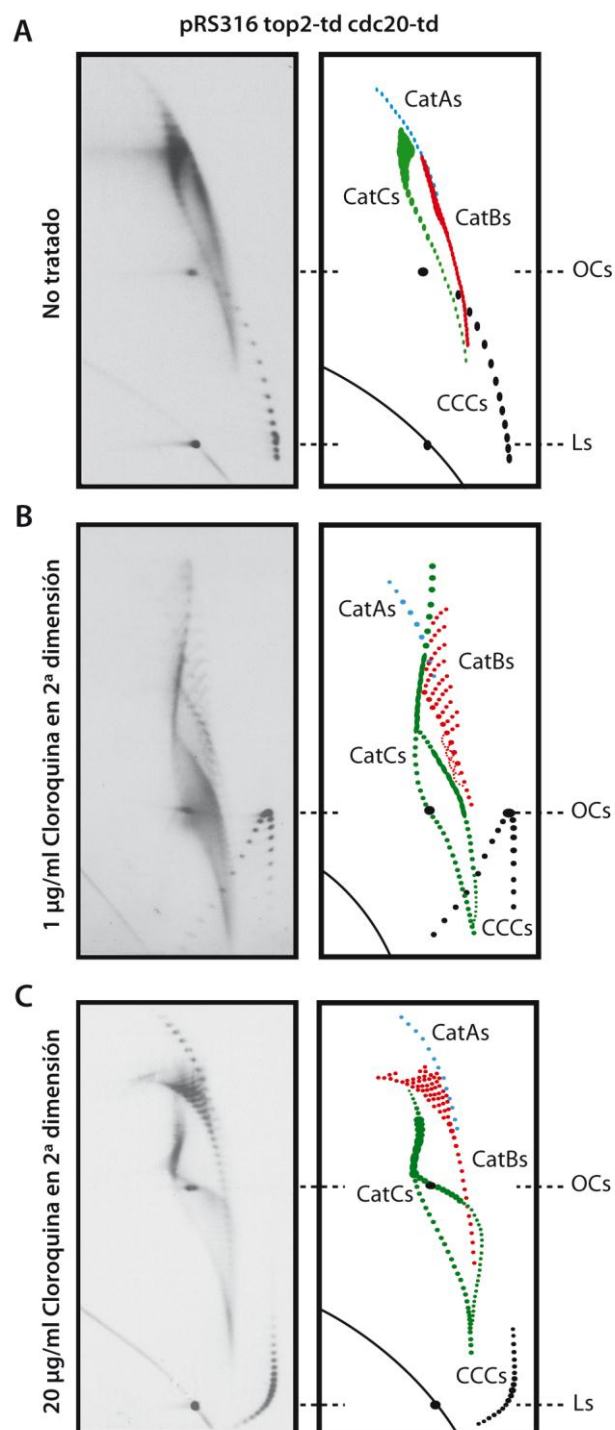


Figura 16. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la mitosis en presencia de cloroquina en segunda dimensión. Células de la estirpe top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. **A.** Inmunodetección del minicromosoma pRS316 en ausencia de cloroquina. **B.** Inmunodetección del minicromosoma en presencia de 1,00 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en segunda dimensión. **C.** Inmunodetección del minicromosoma en presencia de 20,00 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en segunda dimensión. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra el esquema representativo, en color negro se observan las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

A partir de las mismas muestras anteriormente mencionadas se realizó la electroforesis bidimensional en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera dimensión. En todas las muestras se obtuvo una mayor resolución de los Cat B (Figura 11), representados en color rojo en los esquemas explicativos que acompañan a las figuras. La concentración de cloroquina elegida permitió una visualización directa de los topoisómeros de esta especie, facilitando la visualización de diferencias entre la estirpe crecida en presencia y en ausencia de nocodazol, que directamente se pudo relacionar con los Cats C y Cat C* respectivamente, cuya resolución en los experimentos anteriores (Figuras 15 y 16) no había permitido demostrar diferencias.

Los Cat Bs de la muestra crecida en ausencia de nocodazol (Figura 17C) adquirieron forma de arco abarcando más amplitud que los Cat Bs observados en la muestra con nocodazol (Figura 17B), cuya movilidad en primera dimensión fue menor. La cloroquina fue capaz de resolver más eficientemente los Cat Bs permitiendo una mayor movilidad de los mismos, y sugiriendo un superenrollamiento inicial distinto en Cat Cs y Cat Cs*. En el caso de las células crecidas exclusivamente en ausencia de Top2 (Figura 17A) se observó una mezcla de los topoisómeros correspondientes a los Cat Bs, ya que la muestra no estaba enriquecida en ninguna de las especies de Cat Cs.

A partir de estos resultados no fue necesario concentrarse únicamente en los Cat Cs para averiguar su verdadera naturaleza topológica. El estudio se centró en los Cat Bs, los cuales poseen una sola molécula superenrollada en su estructura, siendo más sencillo para la cloroquina “desenmarañar” los topoisómeros que los forman. De esta forma se pudo llegar a una conclusión más exacta sobre el estado topológico de la población superenrollada.

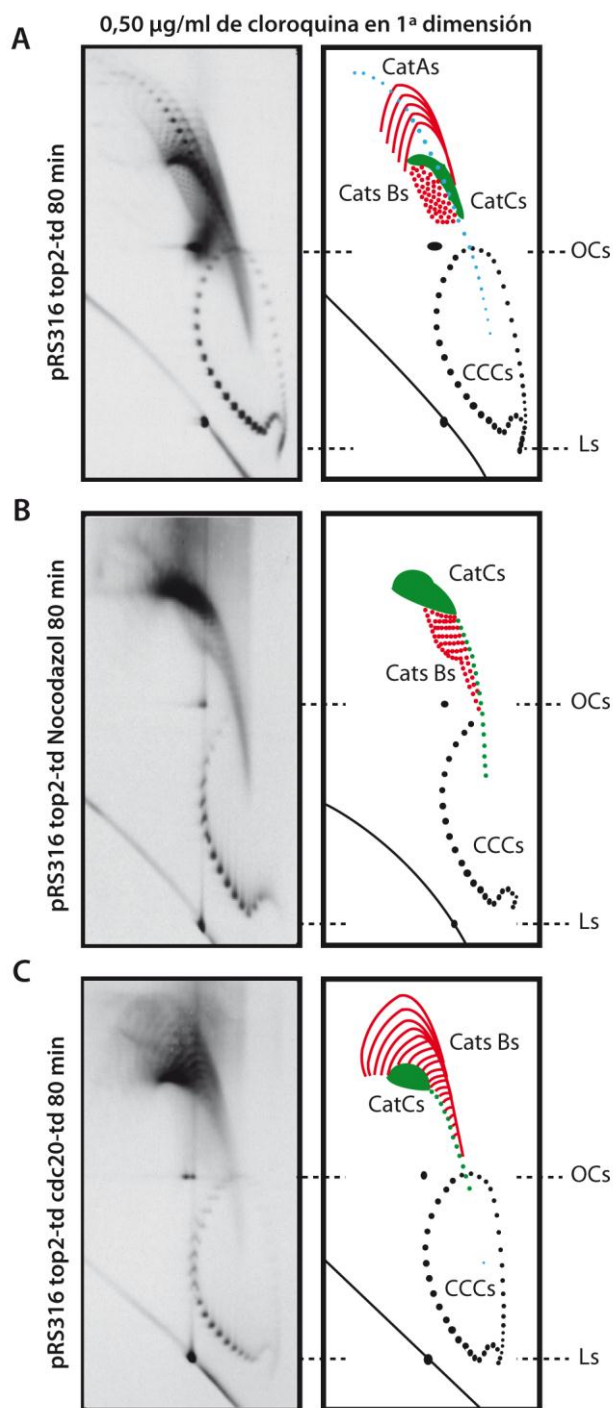


Figura 17. Análisis de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 durante la mitosis en presencia de cloroquina en primera dimensión. Células de la estirpe top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. Las electroforesis bidimensionales se realizaron en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera dimensión. **A.** Inmunodetección del minicromosoma pRS316 en la muestra top2-td crecida en ausencia de Top2 exclusivamente. **B.** Inmunodetección del minicromosoma en la estirpe top2-td cdc20-td crecida en presencia de nocodazol. **C.** Inmunodetección del minicromosoma en la estirpe top2-td cdc20-td. C. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra el esquema representativo, en color negro se observan las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

4.1.2.3 Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de los encadenados mitóticos en la estirpe pRS316 top2-td y pRS316 top2-td cdc-20 en presencia de cloroquina y de Nt. BpU10I.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior abrieron un nuevo camino al estudio de los Cat Cs mediante el análisis de los Cat Bs. Además se pudo vislumbrar una diferencia en el tipo de superenrollamiento que poseían los Cat Cs y los Cat Cs*. Para indagar en esta cuestión se favoreció la presencia de Cat Bs en las muestras mediante un tratamiento de digestión parcial con la endonucleasa de cadena sencilla Nt. BpU10I previa a la electroforesis bidimensional. Se convirtió el mayor número posible de Cat Cs y Cat Cs* a Cat Bs y se analizó por electroforesis bidimensional en presencia de bajas concentraciones de cloroquina en primera dimensión. La presencia de cloroquina en primera dimensión fue la mejor manera de resolver los topoisómeros y desentrañar la naturaleza de su superenrollamiento.

En la Figura 18 se muestran las inmunodetecciones del minicromosoma en las estirpes top2-td y top2-td cdc20-td crecida en presencia y en ausencia de nocodazol. Se recogieron células a los 80 minutos, se aislaron las formas replicativas y se trataron parcialmente con Nt. BpU10I durante 15 minutos a 37 °C. Los geles bidimensionales se realizaron en presencia de 0,50 µg/ml de cloroquina en primera dimensión.

En la imagen correspondiente a la estirpe bloqueada con nocodazol (Figura 18B), en la que se favoreció la presencia de Cat C, la cloroquina aumentó la resolución de los Cat Bs en forma de racimo, sin conseguir modificar tanto su movilidad electroforética como en la muestra crecida en ausencia de nocodazol (Figura 18C) en la que los Cat Bs adquirieron forma de arco correspondiendo con la muestra enriquecida en Cat C*. En la inmunodetección crecida exclusivamente en ausencia de Top2 (Figura 18A) utilizada como control, se observó la acumulación de Cat Bs en forma de racimo y arco debido a que la muestra no estaba enriquecida en ninguna especie de Cat C si no que poseía una mezcla de los mismos.

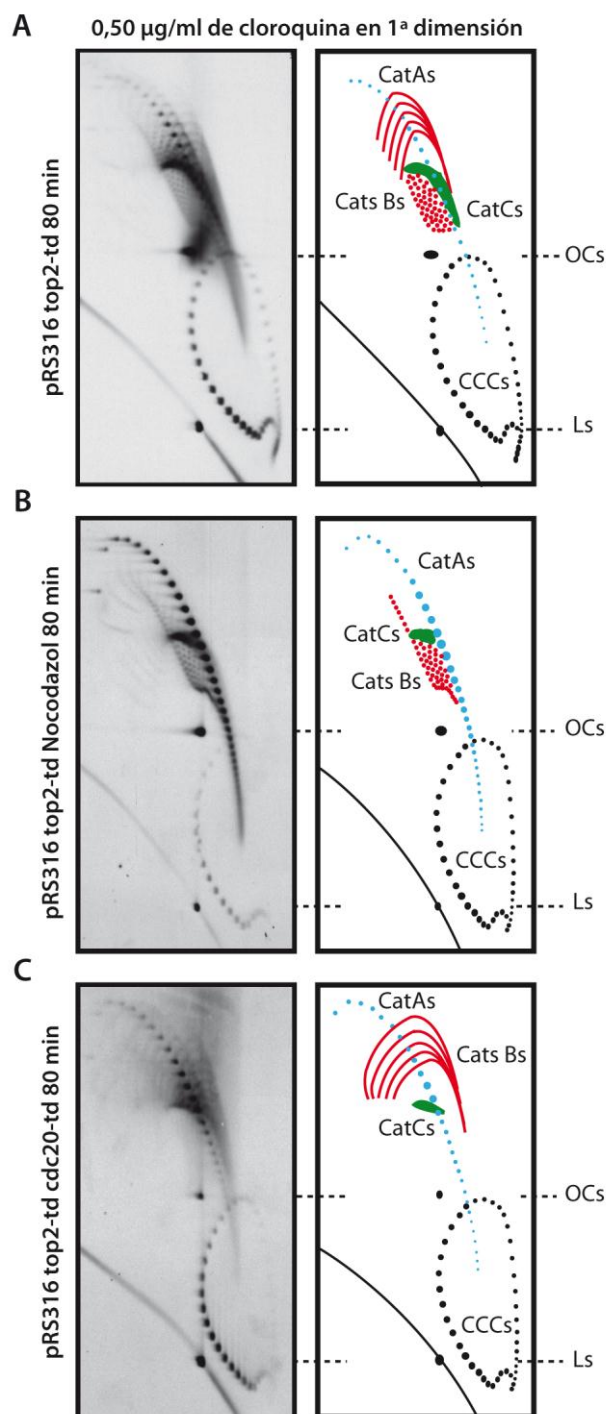


Figura 18. La transición de Cat C a Cat C* se produce por un cambio en el superenrollamiento de (-) a (+). Células de la estirpe top2-td y top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 celular y la proteína Top2 fue degradada junto con el complejo cdc20. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 80 minutos. Las muestras se trataron con 5 unidades de Nt BpU10I durante 30 minutos a 37°C y se realizaron las electroforesis bidimensionales en presencia de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en primera dimensión. **A.** Inmunodetección del minicromosoma pRS316 en la estirpe top2-td. **B.** Inmunodetección del minicromosoma en la estirpe top2-td cdc20-td bloqueada con nocodazol y enriquecida en Cat Cs. **C.** Inmunodetección del minicromosoma en la estirpe top2-td cdc20-td enriquecida en Cat Cs*. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra un esquema representativo, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente

Los resultados demostraron que a iguales concentraciones de cloroquina, el efecto producido sobre la movilidad electroforética de los encadenados fue completamente diferente. Estos resultados indican que los Cat C* poseían inicialmente un superenrollamiento (+) al adquirir una mayor movilidad electroforética a iguales concentraciones de cloroquina frente a los Cat C cuya resolución fue inferior debido a que albergaban superenrollamiento (-). Si además se tiene en cuenta la implicación de los husos mitóticos, su presencia fue la que indujo el cambio en el superenrollamiento de los encadenados en ausencia de Top2.

4.1.2.4 Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de los monómeros en las estirpes pRS316 cdc20-td y pRS316 top2-td cdc-20 durante la mitosis.

El minicromosoma pRS316 entra en mitosis altamente encadenado debido a la degradación de la Top2, por esta razón es posible pensar que la variación observada en el superenrollamiento de los Cat Cs sólo ocurra en esta situación experimental. Por lo tanto, se analizó el superenrollamiento de los monómeros desencadenados por la Top2 inmediatamente después de la replicación del ADN, en presencia y en ausencia de husos mitóticos.

Se partió de dos estirpes diferentes, cdc20-td, que poseía niveles silvestres de Top2, y top2-td cdc20-td, que tenía inhibida la Top2. En ambos casos la proteína cdc20 se degradó para evitar la entrada en anafase. La formación de los husos se evitó mediante el bloqueo con nocodazol, el cual se lavó en los casos necesarios para permitir la formación de los mismos. Se aisló ADN de ambas células en presencia y ausencia de husos mitóticos y se analizaron los monómeros obtenidos mediante geles bidimensionales en presencia de 0,50 µg/ml de cloroquina en primera dimensión y 1,00 µg/ml en segunda dimensión cuyas inmunodetecciones se pueden observar en la Figura 19.

En células crecidas con niveles silvestres de Top2 (Figura 19A) se observaron diferencias en relación al número y localización de los topoisómeros en las muestras con y sin husos mitóticos. En la primera imagen correspondiente a las células crecidas en ausencia de husos mitóticos se observó una mayor resolución de los topoisómeros y su localización más hacia la derecha de la imagen. En cambio en células crecidas en presencia de husos mitóticos su resolución fue menor, migrando más juntas y más hacia la izquierda de la imagen. En células crecidas en ausencia de Top2 (Figura 19B) se apreció una mayor variación en la migración de los topoisómeros distribuyéndose hacia la parte inferior de la imagen en todos los casos. Este cambio en la movilidad electroforética fue más acusada en el caso de estar presente los husos mitóticos. Este cambio en la movilidad electroforética de los monómeros se asoció a un cambio en el superenrollamiento de los mismos, como se muestra en el esquema representativo presentado en la Figura 19C. La distribución de los topoisómeros de los monómeros del minicromosoma pRS316 se relacionó con el superenrollamiento, siendo más (+) conforme se avanza en sentido contrario a las agujas del reloj, es decir cuanto más a la izquierda de la imagen se localiza.

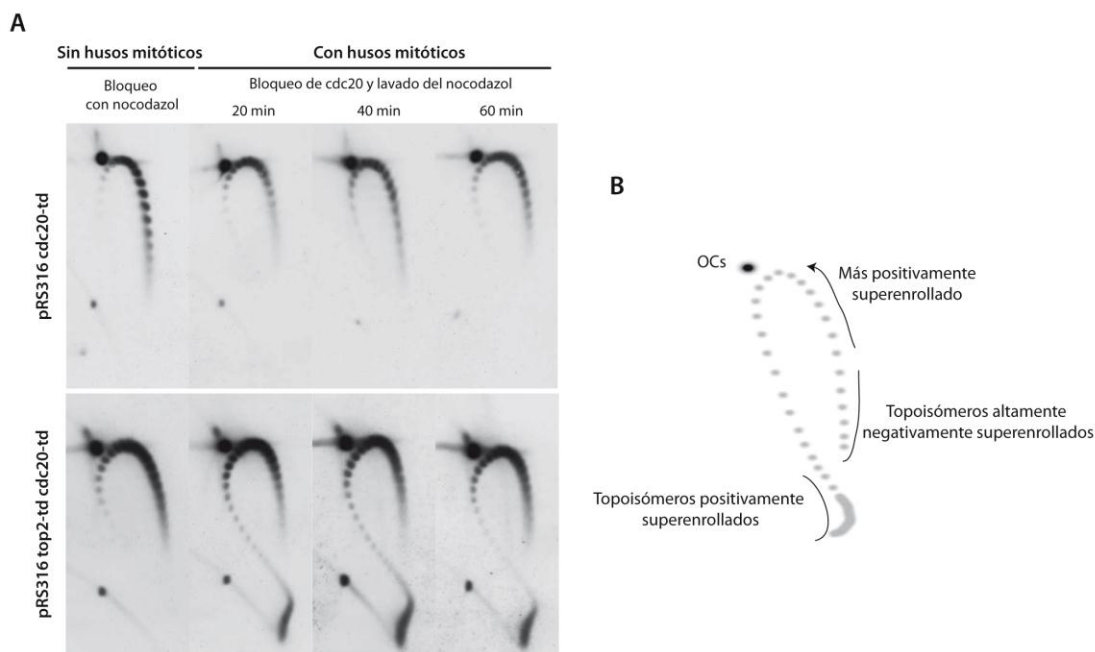


Figura 19. La presencia de los husos mitóticos aumentan el superenrollamiento (+). Células de la estirpe cdc20-td y top2-td cdc20-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1. La proteína Cdc20 se degradó en todos los casos y la Top2 sólo en la segunda estirpe. El ADN aislado en las diferentes condiciones se analizó mediante geles bidimensionales en presencia de 0,50 μ g/ml de cloroquina en primera y 1,00 μ g/ml en segunda dimensión. **A.** Inmunodetección de los monómeros del minicromosoma pRS316 en células cdc20-td crecidas en presencia de nocodazol, primera imagen y en ausencia del mismo, siguientes imágenes hacia la derecha. **B.** Inmunodetección de los monómeros de pRS316 en células top2-td cdc20-td crecidas en presencia de nocodazol, primera imagen y en ausencia del mismo, siguientes imágenes hacia la derecha. **C.** Esquema representativo del signo del superenrollamiento en los topoisómeros observados.

Se concluyó que la presencia de los husos mitóticos favoreció la distribución de los topoisómeros hacia un estado más positivo en ambas estirpes, siendo más acusado este cambio en el superenrollamiento de los topoisómeros de las muestras con la Top2 degradada.

Como conclusión final del análisis del estado topológico del ADN durante la mitosis, se puede afirmar que tanto en los encadenados como en los monómeros se induce un superenrollamiento (+) que es dependiente de la presencia de los husos mitóticos. Sin embargo, este superenrollamiento (+) es rápidamente relajado por la Top2 en condiciones silvestres.

4.1.3 Estudio de los perfiles de ciclo y de la movilidad electroforética de los encadenados en la estirpe pRS316 smc2-8 top2-td durante el ciclo celular.

Se ha demostrado que la formación de los husos mitóticos en ausencia de Top2 induce superenrollamiento positivo en el ADN. Los quinetocoros se fijan a los microtúbulos y éstos a su vez a los husos mitóticos. Se planteó si el ensamblaje de los quinetocoros podría inducir cambios topológicos a través de la activación de complejos asociados a los centrómeros capaces de modular la topología del ADN.

Un posible candidato sería el complejo condensina SMC2/4. Se ha demostrado que las condensinas en presencia de Top1 y ATP *in vitro* son capaces de modificar el superenrollamiento del ADN (Kimura, Hirano et al. 1998; St-Pierre, Douziech et al. 2009). Se planteó si la actividad de la condensina SMC2 era necesaria para observar el superenrollamiento positivo en los Cat C*. Para averiguarlo se realizó el estudio topológico en una estirpe deficiente en esa condensina, smc2-8 top2-td (Freeman, Aragon-Alcaide et al. 2000).

Se partió de un cultivo exponencial de células de la estirpe smc2-8 top2-td conteniendo el minicromosoma crecido a 25°C. Se bloquearon las células en G1 con α -factor y se liberaron de manera sincrónica en el ciclo celular. Se recogieron muestras a intervalos regulares de 20 minutos y se analizaron por citometría de flujo en presencia de IP (Figura 20A). Los perfiles de ciclo mostraron la parada de las células en la fase G2/M como consecuencia de la degradación de la Top2 y la condensina Smc2.

En el estudio de la movilidad electroforética de los encadenados en geles unidimensionales (Figura 20B) se observó la aparición de los Cat C a los 40 minutos los cuales se mantuvieron sin transformarse en Cat C* hasta los 160 minutos. Las formas monoméricas OCs y CCCs se mantuvieron constantes durante todo el estudio.

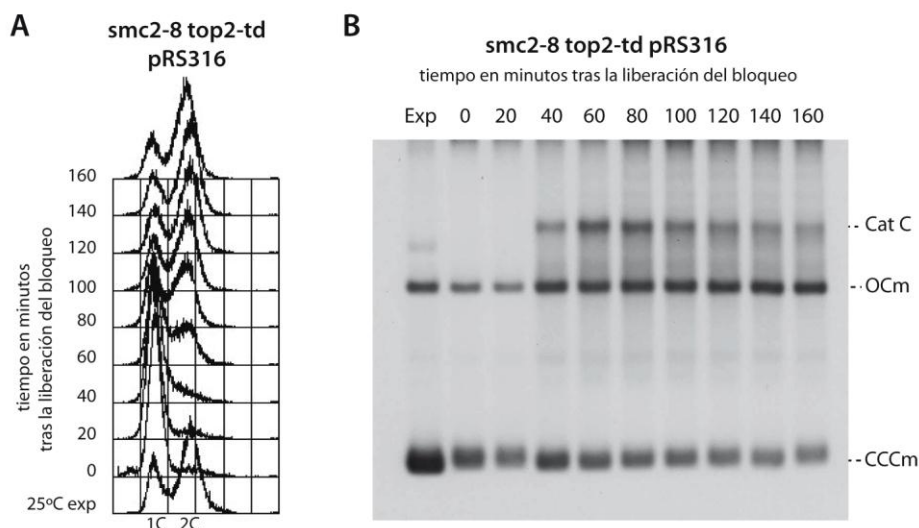


Figura 20. Caracterización de la estirpe smc2-8 top2-td degron. Células de la estirpe smc2-8 top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en fase G1 y la proteína Top2 y Smc2 fueron degradadas. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica, se recogieron y analizaron muestras cada 20 minutos. **A.** Análisis del contenido en ADN por citometría de flujo mediante IP de las muestras obtenidas desde fase exponencial a 25°C, pasando por el bloqueo en G1 y la liberación en el ciclo celular a 37°C. **B.** Estudio de la topología del minicromosoma pRS316 en la estirpe smc2-8 top2-td en electroforesis unidimensional. En la inmunodetección se muestra la movilidad electroforética de las formas monoméricas, CCCs y OCs y de los encadenados Cat Cs del minicromosoma pRS316.

Para confirmar la ausencia de Cat C* se realizó un segundo análisis de la movilidad electroforética de los monómeros en geles bidimensionales en presencia de cloroquina en ambas dimensiones. El análisis se realizó además en células control, pRS316 top2-td, en las que como se ha demostrado anteriormente (Figura 1B) si se observaba la transición de Cat C a Cat C*.

Se partió de dos estirpes diferentes, top2-td, que poseía niveles silvestres de Smc2, y Smc2-8 top2-td, que tenía inhibida Smc2. En ambos casos la proteína Top2 fue degradada. La formación de husos mitóticos se evitó mediante el bloqueo con nocodazol, el cual se lavó en los casos necesarios para permitir la formación de los mismos. Se aisló el ADN de ambas estirpes y se analizaron los monómeros obtenidos mediante geles bidimensionales en presencia de 0,50 μ g/ml de cloroquina en primera dimensión y 1,00 μ g/ml en segunda dimensión (Figura 21).

En los monómeros de la estirpe con niveles silvestres de Smc2 (Figura 21A) se observó que en presencia de husos mitóticos aparecen topoisómeros más positivamente

superenrollados, localizados más a la izquierda, frente a los presentes en su ausencia. En los monómeros de las células que carecen de condensina Smc2 no se observó esta diferencia dependiente de los husos mitóticos. Si comparamos entre sí las muestras aisladas sin husos mitóticos, los monómeros son idénticos en ambas estirpes, independientemente de la presencia de la condensina Smc2, sin apenas albergar superenrollamiento positivo en ninguno de los dos casos.

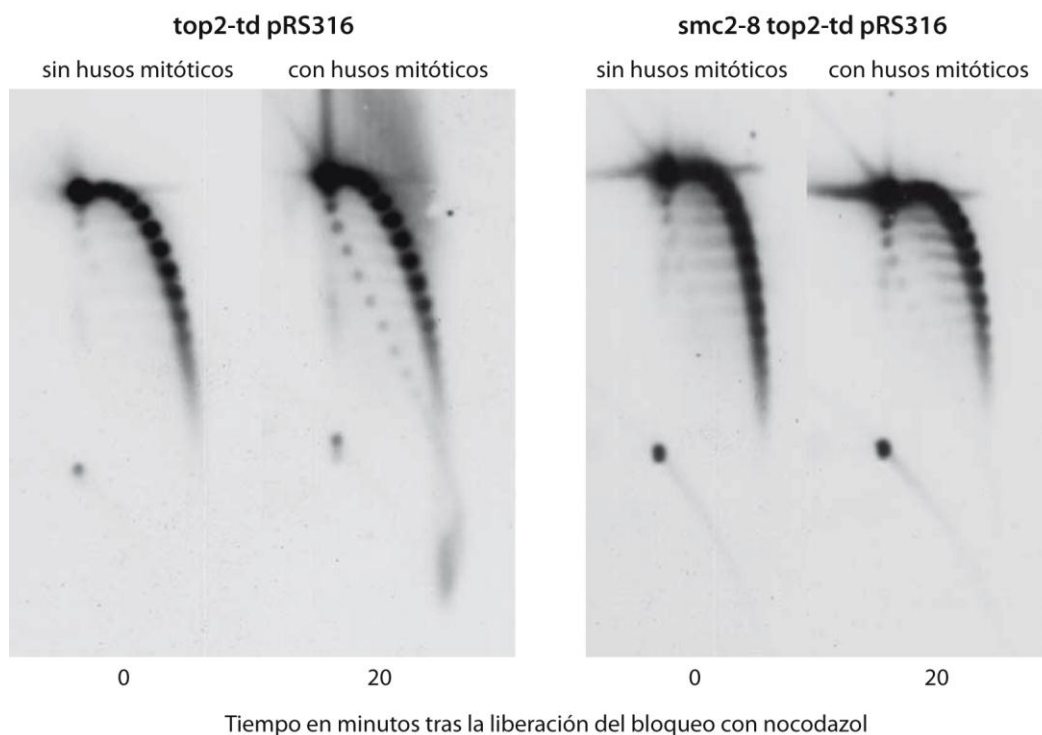


Figura 21. La condensina Smc2 es requerida para la inducción de superenrollamiento (+). Células de la estirpe top2-td y smc2-8 top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en fase G1. La proteína Top2 se degradó en todos los casos y Smc2 sólo en smc2-8 top2-td.. El ADN aislado en las diferentes condiciones se analizó mediante geles bidimensionales en presencia de 0,50 µg/ml de cloroquina en primera y 1,00 µg/ml en segunda dimensión. Inmunodetecciones de los monómeros del minicromosoma pRS316 en las células top2-td y smc2-8 top2-td crecidas en presencia de nocodazol, imagen de la izquierda, y en ausencia del mismo, imagen de la derecha de cada par de imágenes mostradas.

A la vista de los resultados expuestos, se puede afirmar que la función de la condensina Smc2 junto con la formación de los husos mitóticos son necesarias para la adquisición de superenrollamiento (+) durante la mitosis

4.2 Estudio de la replicación y segregación de cromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae*.

Existen evidencias experimentales que indican que la naturaleza circular o lineal de los cromosomas afectan procesos fundamentales del ADN como son su replicación y transcripción (Joshi, Pina et al., 2010). Por ello decidimos estudiar la replicación y segregación de minicromosomas circulares y lineales en células sincronizadas de *S. cerevisiae* en presencia y en ausencia de la topoisomerasa 2.

4.2.1 Construcción de cromosomas artificiales circulares y lineales.

Para comprobar si la iniciación, progreso y terminación de la replicación dependen de la organización de los cromosomas, es decir, de su topología, decidimos construir dos cromosomas artificiales, YACs (de *Yeast Artificial Chromosomes*), uno circular, pYAC_MEM (Figura 22A), y otro lineal, YAC_MEM (Figura 22B), lo que nos permitió abordar individualmente el estudio de la replicación en cada caso. Los cromosomas artificiales se generaron a partir del minicromosoma circular pRS316 que contiene el origen de replicación ARS4, la secuencia de ADN centromérica CEN6 y el marcador de selección para auxotrofía URA3. En el sitio de restricción *XhoI* de este minicromosoma se clonó una región de 3,1 kb que contenía en los extremos repeticiones teloméricas de *Tetrahymena thermophila* separadas por secuencias inertes y el gen de histidina (HIS3). Este fragmento se obtuvo mediante una digestión del minicromosoma pYAC-RC (Marchuk and Collins 1988) con la enzima de restricción *XhoI*. En la introducción ya se describió que estas repeticiones teloméricas son capaces de actuar como telómeros funcionales en *S. cerevisiae* (Shampay and Blackburn 1989). Además se añadieron dos secuencias del fago Lambda, L1 y L2, a ambos lados de las repeticiones teloméricas para facilitar la posterior inmunodetección no radiactiva.

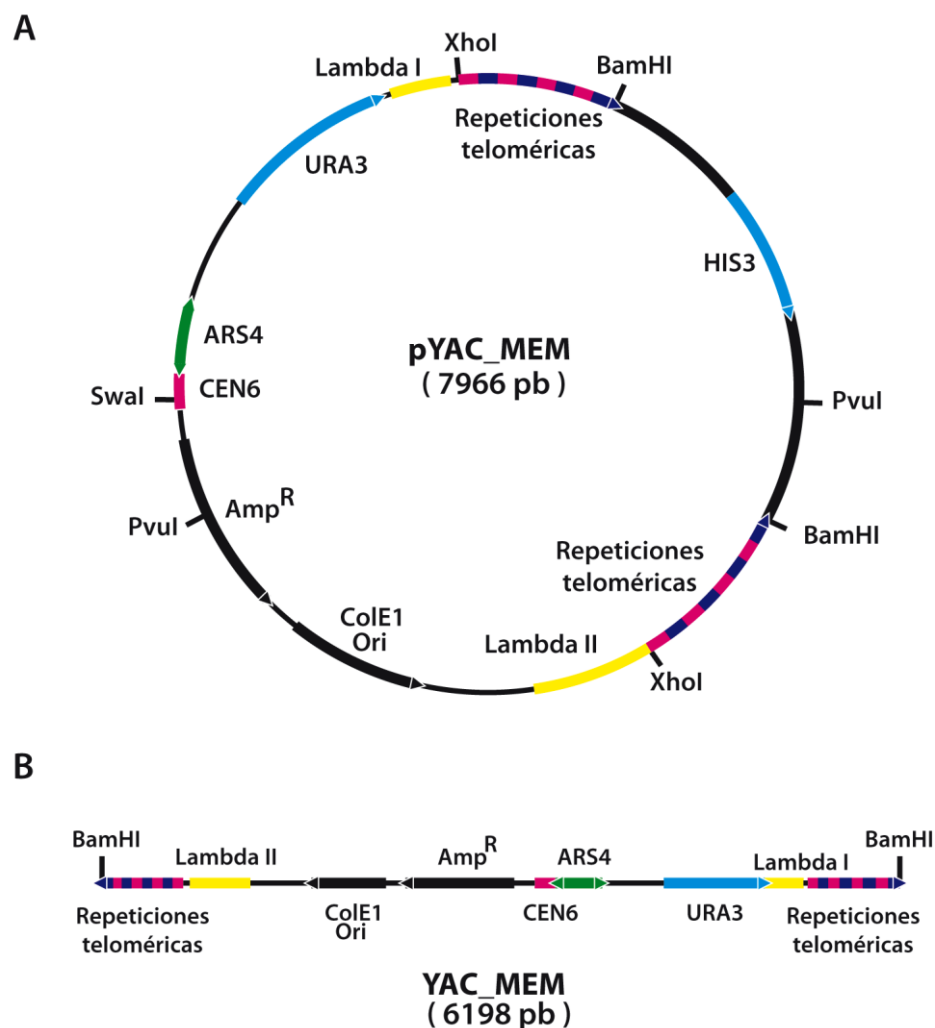


Figura 22. Mapas genómicos de los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM. A. Ilustración esquemática de los elementos y enzimas de restricción más importantes de pYAC_MEM. **B.** Ilustración esquemática de los elementos y enzimas de restricción relevantes en el estudio de YAC_MEM.

Una vez obtenidos los minicromosomas en *E. coli* y confirmada su secuencia, se los utilizó para transformar células de la estirpe top2-td de *S. cerevisiae*, portadora de una mutación de tipo degrón en la Top2, lo que permite su degradación en condiciones de crecimiento restrictivo, como ya se ha descrito con anterioridad. La tasa de transformación con la forma circular del minicromosoma fue de 2.300 colonias por μg de ADN mientras que para la forma lineal se obtuvieron 5.600 colonias por μg de ADN. Aunque la tasa de transformación con la forma lineal fue mayor, se encontraron dificultades a la hora de obtener colonias con la forma intacta, debidas a su tendencia a recombinar consigo misma. En el *southern* de comprobación de la transformación con YAC_MEM (Figura 23B) se ilustra este problema. Se escogieron 11 colonias y menos del 30% contenía la forma lineal intacta. Como control de transformación se utilizó el

mismo minicromosoma crecido en *E. coli*. Se eligió la colonia número 5 de la transformación con el cromosoma circular pYAC_MEM y la colonia número 2 de la transformación con el cromosoma lineal YAC_MEM.

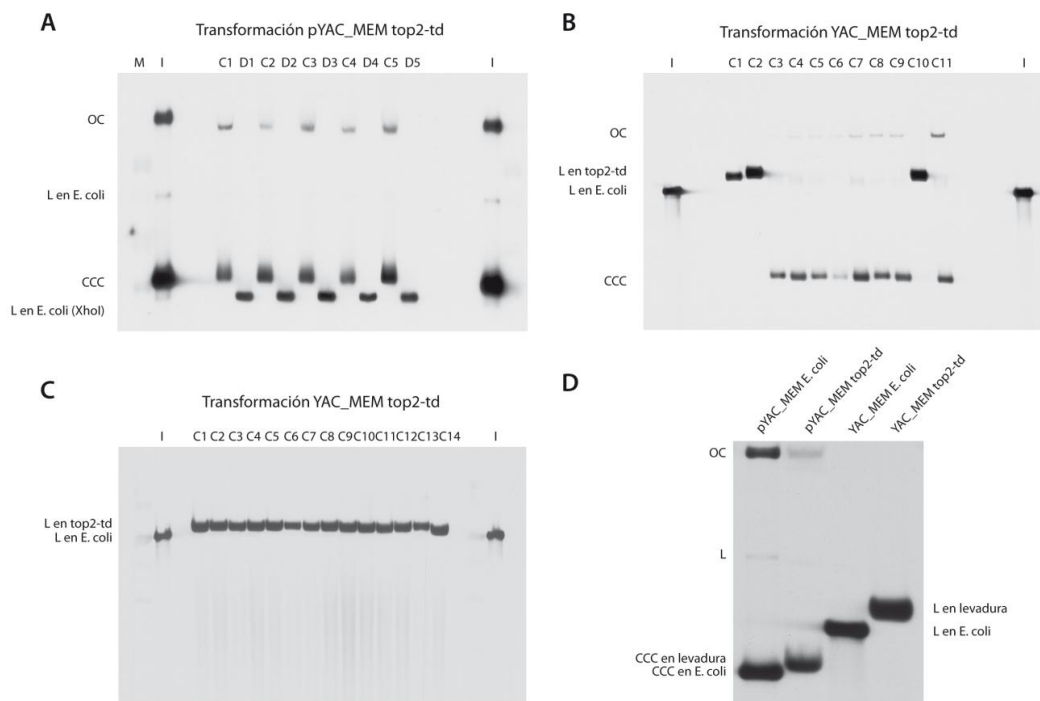


Figura 33. Estudio de la transformación de células de *E. coli* y *S. cerevisiae* con pYAC_MEM y YAC_MEM. A. Inmunodetección de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td con pYAC_MEM mediante la sonda L2. Se examinaron 5 colonias crecidas en placa en condiciones de auxotrofia para el gen de uracilo. El ADN se digirió con la enzima de restricción XhoI. Como control se utilizó el minicromosoma pYAC_MEM aislado de *E. coli*. B. Inmunodetección de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td con el minicromosoma lineal YAC_MEM extraído de *E. coli* luego de su digestión con BamHI mediante la sonda L2. Se examinó el ADN de 10 colonias crecidas en placa en condiciones de auxotrofia para el gen de uracilo. Como control se utilizó el minicromosoma YAC_MEM aislado de *E. coli*. C corresponde al ADN intacto, D al ADN digerido, I al ADN intacto extraído de bacterias y M al marcador Mass Ruller. C. Inmunodetección de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td transformadas con el minicromosoma YAC_MEM lineal extraído de levaduras mediante la sonda L2. Se examinaron 14 colonias crecidas en condiciones de auxotrofia para el gen de uracilo. D. Inmunodetección comparativa de transformaciones de células de *E. coli* y *S. cerevisiae* con las formas circulares y lineales de los minicromosomas.

En el apartado C de la misma Figura se muestra la inmunodetección de la transformación de YAC_MEM extraído directamente de levaduras. Se comprobó experimentalmente la transformación de 14 colonias con la forma lineal intacta.

Moléculas circulares existen tanto en procariotas como en eucariotas. Existen diferencias significativas, no obstante, en la manera en que el ADN se organiza en

procariotas y eucariotas, y algunas de éstas afectan a la topología del ADN (Germond, Hirt et al. 1975). En la Figura 23D se muestra la movilidad electroforética de las formas circulares y lineales correspondientes a los minicromosomas obtenidos de *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Se observó un distinto comportamiento electroforético dependiendo de su crecimiento en bacterias o en levaduras. El cromosoma circular aislado de *E. coli* presentó mayor movilidad electroforética con respecto al cromosoma circular aislado de levaduras. Este aumento en la movilidad electroforética es debido al mayor superenrollamiento (-) que presentan los plásmidos bacterianos con respecto a sus homólogos en levaduras (Mayan-Santos, Martínez-Robles et al. 2007). Por otro lado, la diferencia de movilidad observado en el cromosoma lineal, es consecuencia de la incorporación de repeticiones teloméricas por parte de la levadura, incrementando de esta forma su tamaño y por lo que migra a una altura superior a la correspondiente para la forma lineal de *E. coli*.

4.2.2 Estudio del ciclo celular de células de *S. cerevisiae* de la estirpe top2-td transformadas con los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM.

En primer lugar se realizó un estudio del progreso sincrónico de las células de levaduras a lo largo del ciclo celular por citometría de flujo. Se estudiaron células de la estirpe top2-td transformadas con las dos formas del YAC en ausencia de Top2. El objetivo era averiguar si se observaban diferencias a nivel celular entre ambos tipos celulares. Se crecieron las células a 25 °C hasta fase exponencial. Se las sincronizó con alfa-factor y se degradó la Top2 a 37°C en presencia de galactosa y doxiciclina.

Los perfiles de ciclo de muestras recogidas cada 30 minutos se muestran en la Figura 24. Sólo se muestra la serie correspondiente a las células transformadas con el minicromosoma lineal, ya que no se observaron diferencias a nivel de ciclo celular entre la estirpe transformada con el minicromosoma circular y con el minicromosoma lineal. Se aprecia que las células entraron en fase S y la completaron sin ningún problema aparente, por lo que confirmamos que la replicación ocurre normalmente en ausencia de Top2. A partir de 120 minutos, sin embargo, se observó que las células se acumularon en G2/M sin poder reiniciar un nuevo ciclo. A partir de 240 minutos, las células en

G2/M adquieren un contenido de ADN equivalente a 4C, lo que indica la dificultad de las cromátidas hermanas para segregarse debido a ausencia de Top2, la única topoisomerasa eucariota capaz de desencadenar las cromátidas hermanas.

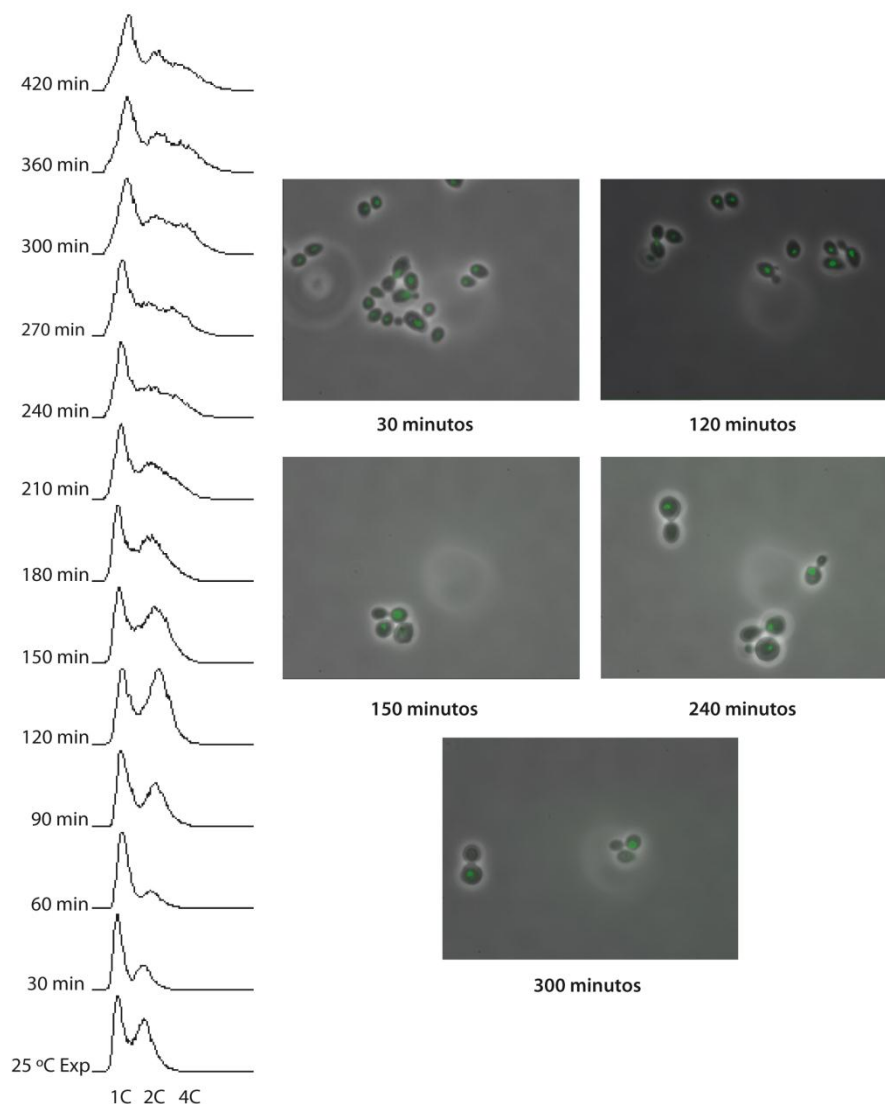


Figura 24. Estudio de los patrones de ciclo en la estirpe top2-td. Se creció un cultivo de células top2-td transformadas con YAC_MEM desde fase exponencial en presencia de galactosa y doxiciclina a la temperatura restrictiva: 37°C. Se recogieron muestras cada 30 minutos hasta los 420 min. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en presencia de Sytox Green y se tomaron imágenes al microscopio de contraste de fase. A la derecha de la citometría se muestran imágenes de células a los tiempos indicados.

A la derecha de los perfiles de carga se muestran imágenes tomadas al microscopio de contraste de fase en diferentes momentos del estudio. En color verde se marcan los núcleos celulares.

4.2.3 Estudio de la topología de pYAC_MEM durante la replicación y la segregación celular en presencia y en ausencia de Top2.

El experimento anterior permitió concluir que las células de levaduras transformadas con la forma lineal y circular del YAC son capaces de completar su replicación en ausencia de Top2. Por ello se decidió analizar la topología de los minicromosomas a nivel molecular. La electroforesis bidimensional permite distinguir ambas formas por lo que decidimos estudiar su topología en presencia y ausencia de Top2.

Se partió de un cultivo de células top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial. Se bloqueó el cultivo en G1 con α -factor y se liberaron las células de forma sincrónica en presencia y en ausencia de top2-td. Se recogieron células a los tiempos de 0, 20, 40, 60 y 80 minutos. Se recogieron alícuotas que se analizaron por citometría de flujo (Figura 25) para comprobar la sincronía y la entrada en ciclo al eliminar el α -factor. En la serie de la derecha, que corresponde a las células con la Topo2 degradada, se apreció un ligero retraso en la salida del bloqueo en G1, que resulta evidente al comparar los perfiles de 20 y 40 minutos con los perfiles de la estirpe silvestre que se muestra a la izquierda. No obstante, este retraso se compensó en los tiempos de 60-80 minutos, en los que además se observó un aumento en el contenido en ADN por célula en las muestras correspondientes a la estirpe mutada.

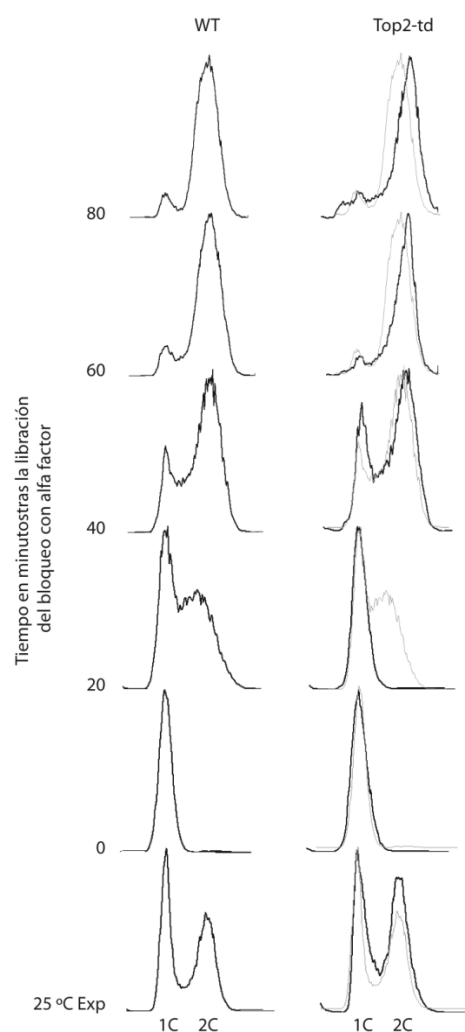


Figura 25. Estudio del ciclo celular de células sincronizadas de la estirpe top2-td crecidas en presencia y en ausencia de Top2. Células de la estirpe top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica en el ciclo celular en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células cada 20 minutos. Se fijaron con etanol y analizaron por citometría de flujo en presencia de Sytox Green. Se muestran los patrones obtenidos de ambas estirpes, en presencia de Top2 a la izquierda y con la topoisomerasa degradada a la derecha.

4.2.4 Análisis de la iniciación, progresión y terminación de la replicación de pYAC_MEM mediante electroforesis bidimensional.

Para el análisis de intermediarios de replicación (IsR) del minicromosoma circular se partió de un cultivo exponencial de células top2-td transformadas con pYAC_MEM bloqueadas en G1 con alfa-factor. Las células se liberaron del bloqueo de forma sincrónica y se recogieron a los 40 minutos para asegurar la presencia de formas replicativas. Todo ello se realizó en presencia de niveles silvestres de Top2.

Posteriormente a la extracción de IsR, se digirió el ADN con diferentes combinaciones de enzimas para estudiar y confirmar los patrones de replicación del cromosoma circular en geles bidimensionales.

En la parte superior de la Figura 26 se muestra el mapa del cromosoma circular pYAC_MEM sobre el que se indican los elementos más relevantes y los sitios de reconocimiento de las enzimas *Bam HI*, *SwaI* y *PvuI*. Mediante distintas combinaciones de las mismas se generaron cuatro fragmentos lineales, cuyos mapas se detallan en los apartados A, B, C y D de la misma Figura, indicando además el tamaño y la posición relativa de los elementos más relevantes que contiene cada uno de ellos. A la hora de estudiar la replicación de estos fragmentos se dividieron a su vez en dos grupos, los que contenían el ARS, lo que permitió realizar el análisis de la iniciación y progresión de las horquillas de replicación (Figura 26A y B), y los que carecían de este elemento, lo que permitía el estudio de la progresión y terminación de las horquillas de replicación (Figura 26C y D).

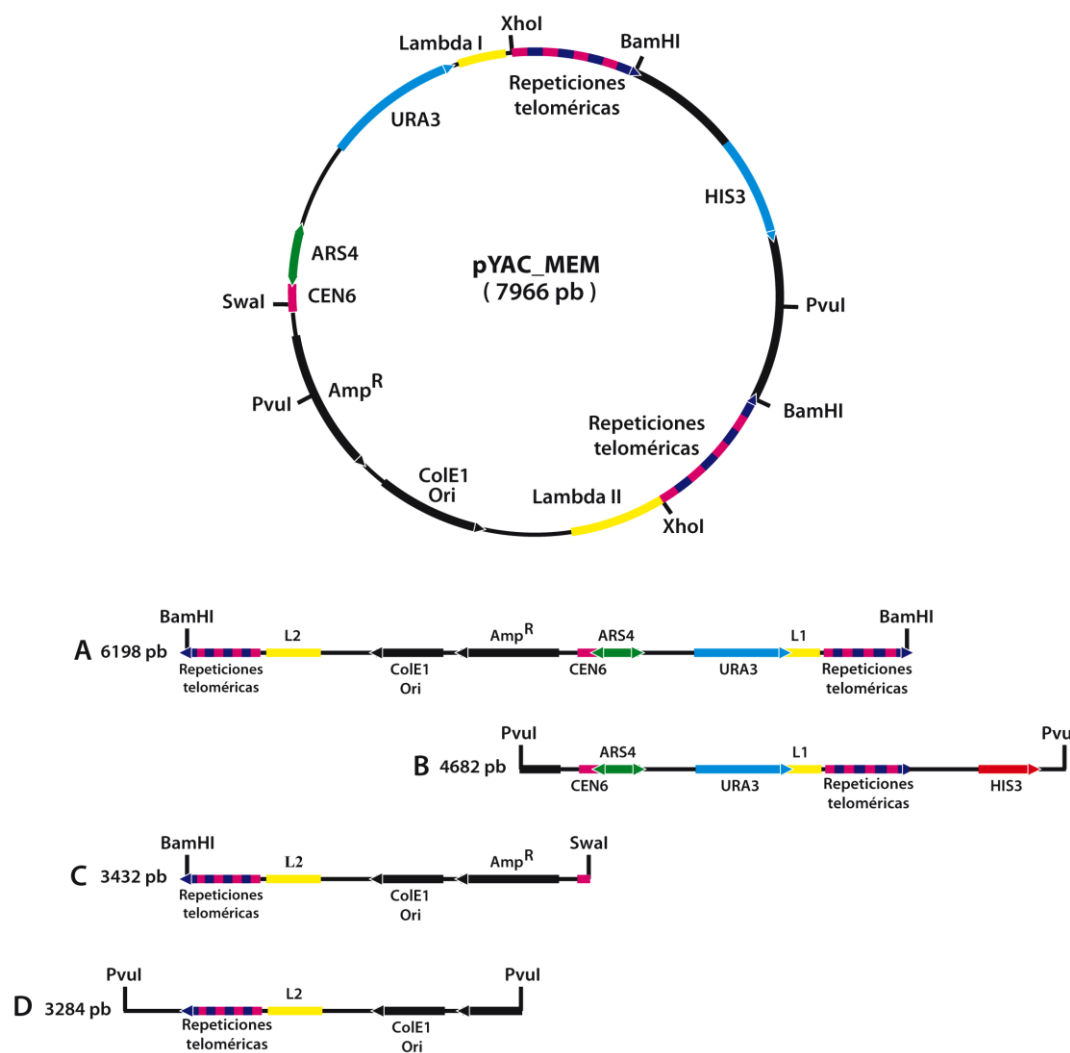


Figura 26. Mapas genómicos de los fragmentos de estudio obtenidos por digestión enzimática de pYAC_MEM. A. Ilustración esquemática del fragmento pYAC_MEM *BamHI-BamHI* de 6198 pb. B. Ilustración esquemática del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI* de 4682 pb. C. Ilustración esquemática del fragmento pYAC_MEM *BamHI-SwaI* de 3432 pb. D. Ilustración esquemática del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI* de 3284 pb.

Las enzimas *BamHI* y *PvuI* (Figura 26) presentan dos sitios de reconocimiento en el minicromosoma circular, por lo que las digestiones con dichas enzimas generan dos fragmentos en cada caso (Figura 3A y B respectivamente).

El fragmento pYAC_MEM *BamHI-BamHI* (Figura 26A) presenta un tamaño de 6189 pb en el que el origen ARS4, marcado en color verde, está ligeramente desplazado a la derecha del centro. En la Figura 27A se muestra la inmunodetección correspondiente al pYAC_MEM *BamHI-BamHI* obtenida mediante la detección con la sonda L2 así como el esquema interpretativo de las señales observadas en la

electroforesis bidimensional. En color rojo se representa el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples, en azul el arco de Y dobles y en negro el arco de recombinantes a la izquierda y el arco de lineales en parte inferior.

Con el fin de interpretar el significado de las señales se utilizó el programa de simulación 2D_Gels (Viguera, Rodriguez et al. 1998). Este programa permite simular los patrones que generan los intermediarios de replicación de un fragmento determinado cuando se los analiza por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Igualmente, permite indagar cómo debería replicar un fragmento determinado para generar unos patrones específicos. Es en esta última capacidad del programa en la que nos basamos para averiguar cómo replican pYAC_MEM y YAC_MEM en *S. cerevisiae* en presencia y en ausencia de Topo II.

En todos los casos se asumió que la iniciación de la replicación ocurre de forma bidireccional desde el origen ARS4. En el panel (i) de la Figura 27A y las siguientes, se asumió que las horquillas se desplazaron bidireccionalmente y a la misma velocidad sin impedimento alguno, lo que debería generar una señal de burbujas que se convierte en Y simple cuando el intermediario alcanza una masa de 1,85x como indica la flecha de color rojo, al alcanzar la horquilla que se mueve hacia la derecha el final del fragmento. En el segundo panel (ii) se asumió que la horquilla que se desplaza en el sentido contra las agujas del reloj sufre una parada temporal cuando alcanza el CEN6, zona en la que se ha demostrado una ralentización de la replicación (Furuyama and Henikoff 2009). La horquilla que se mueve derecha favor de las agujas del reloj, por otra parte, se desplaza de manera uniforme lo que determina que la forma de los intermediarios cambie de burbuja a Y simple al alcanzar dicha horquilla el extremo del fragmento. Esto ocurre cuando los intermediarios adquieren una masa de 1,43x como indica la flecha de color rojo. Dado que se asume que el bloqueo de la horquilla que se desplaza en el otro sentido es temporal, la misma reanuda su marcha avanzando a la misma velocidad que poseía antes de detenerse y terminando la replicación del fragmento en estudio sobre el arco de lineales cuando los IsR adquieren forma de Y simple. El tercer modelo se presenta en la serie (iii) y corresponde al supuesto de que la horquilla que se mueve en contra de las agujas del reloj se detenga en CEN6 de forma permanente. En este caso la horquilla que se desplaza hacia la derecha a velocidad constante alcanza el extremo

derecho del fragmento con una masa de 1,43x momento en el cual los IsR con forma de burbuja se convierten en Y simple por un corto periodo de tiempo. No debemos olvidar que estamos estudiando un plásmido circular por lo que la horquilla no detenida debería volver a entrar por el extremo izquierdo del fragmento en estudio, teniendo en cuenta que a su paso por el gen de histidina podría sufrir una ralentización. Dado que el fragmento en estudio contendría una horquilla detenida, el desplazamiento de la otra horquilla hacia la derecha generaría IsR con forma de Y doble cuya señal partiría del arco de Y simples hacia el arco de recombinantes, con forma de gancho, debido a que su masa inicial es de 1,44x, señalado en la figura mediante una flecha azul. La terminación de la replicación se produciría sobre el arco de recombinantes, muy cerca del punto medio de la señal lo que indicaría el parecido de los intermediarios con forma de Y-doble con formas recombinantes de la misma masa.

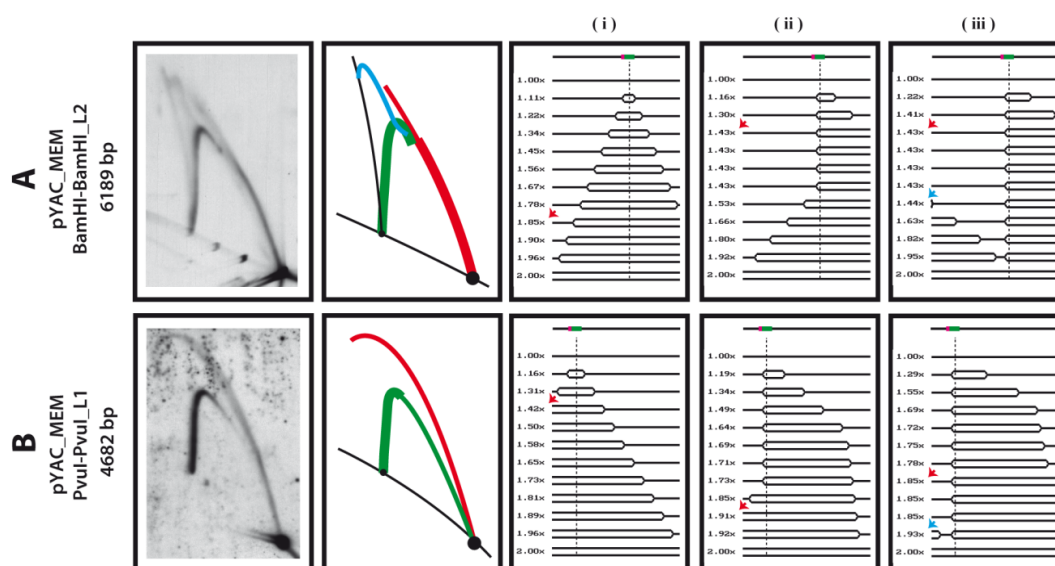


Figura 27. Estudio de los IsR de los fragmentos pYAC_MEM *BamHI-BamHI* y pYAC_MEM *PvuI-PvuI*. Células pYAC_MEM top2-td crecidas en presencia de Top2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos y se aislaron las formas replicativas. **A.** IsR de replicación del fragmento pYAC_MEM *BamHI-BamHI*. **B.** IsR de replicación del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI*. En el primer panel se muestra la inmunodetección de los IsR detectados con la sonda L2 y L1 respectivamente. El segundo panel corresponde al esquema interpretativo de las autoradiografías. En los paneles siguientes (i,ii,iii) se muestran las formas de los IsR esperados obtenidos mediante el programa de simulación 2DGels.

En la Figura 27B se muestra la inmunodetección y el correspondiente diagrama interpretativo del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI*, así como los patrones esperados de los IsR simulados con el programa 2D Gels. El tamaño del fragmento de estudio fue

de 4682 pb y presentó en su estructura el ARS4 posicionado cerca del extremo izquierdo del mismo. La detección se realizó mediante la sonda L1. En el esquema interpretativo de la autoradiografía se representa en color rojo el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples y en negro el arco de lineales. Al igual que en el apartado anterior, se asumió que la iniciación de la replicación tuvo lugar de forma bidireccional desde el ARS4. En el primer panel (i) se asume que las horquillas viajan a la misma velocidad sin restricciones. La horquilla que se movió en contra del sentido del reloj, debido a la localización del ARS4, alcanza el extremo del fragmento con una masa aproximada de 1,43x, masa correspondiente a la transición de burbuja a Y simple que se indica en el diagrama con una flecha en color rojo. En el segundo panel (ii) se asume que la horquilla que se desplazó en el sentido de las agujas del reloj sufrió un bloqueo temporal en CEN6 al igual que en el caso del estudio del fragmento pYAC_MEM *BamHI-BamHI* (Figura 4Aii). La re-entrada de la horquilla en el fragmento en estudio se produjo con una masa aproximada de 1,75x. Por otro lado, como ya se ha mencionado anteriormente, la horquilla que se desplazó en el sentido de las agujas del reloj sufre una ralentización al alcanzar y sobrepasar el gen de histidina. El programa de simulación predice que la horquilla que se desplaza en el sentido en contra de las agujas del reloj, a pesar de su bloqueo parcial, alcanza el extremo del fragmento más rápidamente que su homóloga observándose la transición de la señal de burbuja a Y simple con una masa de 1,91x, señalada mediante una flecha de color rojo. En el tercer patrón de replicación esperado (iii) se asume que la horquilla que se desplaza en el sentido en contra de las agujas del reloj se bloquea de forma permanente al alcanzar CEN6. La horquilla que se desplaza en el sentido de las agujas del reloj, por otro lado, continúa a velocidad constante hasta alcanzar el gen de histidina sufriendo una disminución de la velocidad a su paso y recuperándola al finalizar su replicación. Esta horquilla alcanza el extremo derecho del fragmento con una masa de 1,85x y cambia la señal de burbuja a simple Y. Debido a la circularidad del minicromosoma en estudio, la horquilla volvería a aparecer en el extremo izquierdo del fragmento en estudio en el momento en el que ocurriría una nueva transición de Y simple a Y doble con una masa aproximada de 1,93x, señalada en el diagrama con una flecha de color azul.

Retomando la Figura 26C y D, nos faltaría por analizar los fragmentos digeridos con la combinación de enzimas: *BamHI-SwaI* y *PvuI-PvuI*, respectivamente. Ambos

fragmentos de estudio presentan la particularidad de no poseer el origen de replicación ARS4, por lo que no se deberían visualizar arcos de burbujas pero si dobles-Ys que caracterizan las terminaciones de la replicación.

Comenzando por el fragmento pYAC_MEM *BamHI-SwaI* (Figura 28C), su inmunodetección se presenta acompañada del diagrama interpretativo y el análisis de los IsR esperados obtenidos mediante simulación con el programa 2D-Gels. El fragmento tiene un tamaño de 3432 pb y los patrones generados por los intermediarios de replicación se detectaron mediante hibridación con la sonda L2. En la ilustración interpretativa se presenta en color verde el arco de Y simples, en azul el arco de Y dobles y en negro el arco de recombinantes a la izquierda y el arco de lineales en la parte inferior. Además se señala en azul claro una región triangular por debajo del arco de Y dobles correspondiente a la zona indefinida de terminación de la replicación. Siguiendo la misma dinámica de interpretación realizada en la Figura 4 se muestran tres modelos de replicación correspondientes a las tres condiciones descritas con anterioridad.

En todos los casos se asumió que la iniciación de la replicación se produjo en el ARS4. En el primer panel (i) dada la localización del ARS4, el fragmento en estudio sería replicado por una sola horquilla que se mueve de derecha a izquierda generando IsR con forma de simple Y. En el segundo modelo (ii), el retraso temporal de la horquilla en CEN6 daría tiempo a la otra horquilla a entrar en el fragmento en por el extremo izquierdo lo que da lugar a una transición de Y simple a Y doble con una masa de 1,88x terminando la replicación sobre el arco de recombinantes. Debido a que el encuentro de las dos horquillas que viajan en direcciones opuestas ocurriría con una masa muy cercana a 2x, se observaría un aumento de la intensidad de la señal en esta localización sobre el arco de recombinantes. En el tercer modelo (iii) el progreso de la horquilla que se desplaza en contra de las agujas del reloj se detendría permanentemente en CEN6 por lo que esta horquilla no entraría en el fragmento en estudio, siendo el fragmento replicado unidireccionalmente por la horquilla que se desplaza en sentido contrario dando lugar una Y simple completa.

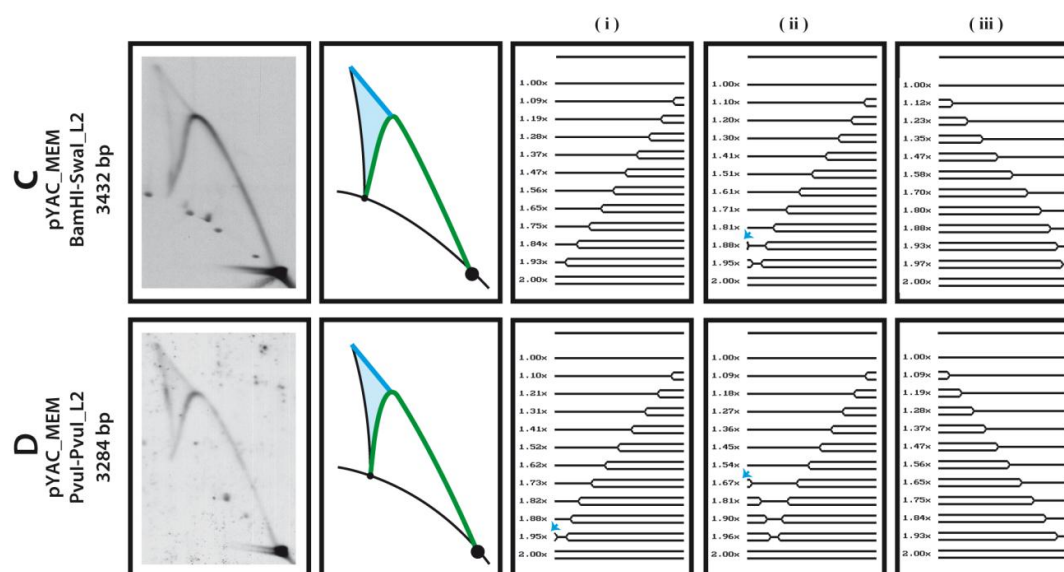


Figura 28. Estudio de los IsR de los fragmentos pYAC_MEM *BamHI-SwaI* y pYAC_MEM *PvuI-PvuI*. Células pYAC_MEM top2-td crecidas en presencia de Top2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos y se aislaron las formas replicativas. **C.** IsR de replicación del fragmento pYAC_MEM *BamHI-SwaI*. **D.** IsR de replicación del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI*. En el primer panel se muestra la inmunodetección de los IsR detectados con la sonda L2. El segundo panel corresponde al esquema interpretativo. En los paneles siguientes (i,ii,iii) se muestran los patrones de los IsR esperados obtenidos mediante el programa 2DGels.

La inmunodetección del fragmento pYAC_MEM *PvuI-PvuI* (Figura 28D) se muestra acompañada de su diagrama interpretativo, así como de los tres patrones de la replicación simulados con el programa 2D-Gels. El fragmento de estudio tiene un tamaño de 3284 pb y se detectó mediante la sonda L2. En el dibujo interpretativo se presenta en color verde el arco de Y simples, en azul el arco de Y dobles y en negro el arco de recombinantes a la izquierda y el arco de lineales en la parte inferior. Además se señala en color azul claro una región triangular por debajo del arco de Y dobles correspondiente a la zona inespecífica de terminación de la replicación. En el primer modelo de los IR (i) se observa un patrón muy parecido al analizado en el pYAC_MEM *BamHI-SwaI* (Figura 5A) con la única diferencia de que la Y simple no sería completa existiendo una transición a Y doble debido a la entrada en el fragmento en estudio de la horquilla que se movió en el sentido de las agujas del reloj por el extremo izquierdo cuando los intermediarios de replicación alcanzaban una masa correspondiente a 1,95x, marcado con una flecha en color azul. En el segundo modelo (ii) la entrada de la horquilla que se movió en el sentido contra las agujas del reloj por el extremo izquierdo del fragmento se produjo con una masa inferior, 1,67x, marcado con una flecha de color

azul. El bloqueo parcial sufrido por la horquilla que se desplazó de derecha a izquierda en CEN6 favoreció la entrada de la otra horquilla en el fragmento en estudio. La terminación de la replicación se produciría en un punto que determinaría el aumento de la intensidad de la señal sobre el arco de recombinantes a una altura mayor que en el apartado anterior. En el tercer panel (iii) se observó el mismo patrón de IsR de replicación que el observado en pYAC_MEM *BamHI-SwaI*, la horquilla que se desplaza en contra de las agujas del reloj sufrió un bloqueo permanente en CEN6 por lo que la horquilla que se mueve en el sentido de las agujas del reloj replica el fragmento en estudio unidireccionalmente generando un arco de Y simples completo.

Es posible que los resultados obtenidos se deban a la integración de los minicromosomas en los cromosomas de la levadura. Por ello decidimos averiguar si una vez realiza la transformación los minicromosomas se mantenían como elementos extra-cromosómicos o bien se integraban. Para ello, además de los experimentos ya descritos, también se analizaron en geles unidimensionales las muestras utilizadas para la observación de los IsR de las digestiones con *BamHI* y *PvuI*. Las inmunodetecciones se realizaron con dos sondas diferentes, L1, que hibrida exclusivamente con el cromosoma circular y URA3, que hibrida con el ADN genómico de la levadura y con el cromosoma circular, como se muestra en la Figura 29. Los patrones de bandas observados confirmaron la naturaleza extra-cromosómica del pYAC_MEM.

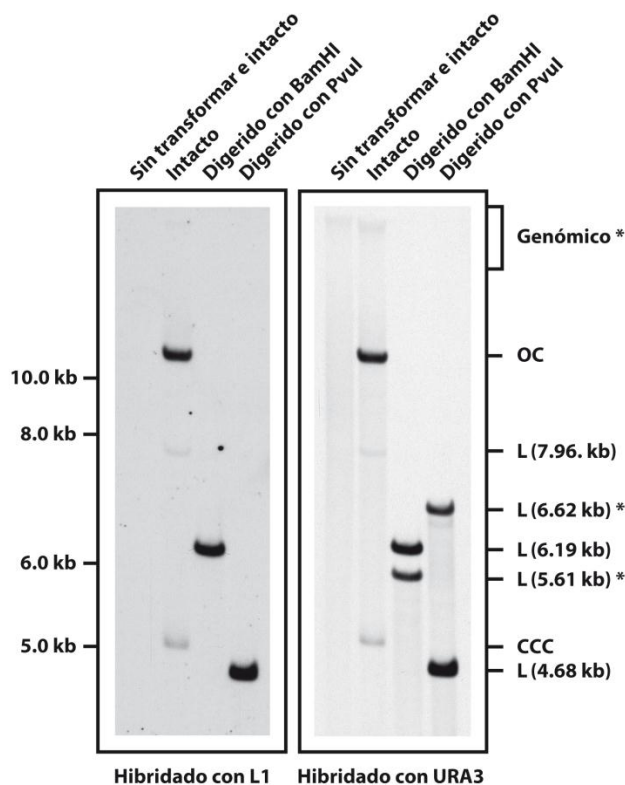


Figura 29. pYAC_MEM permanece como un elemento extra-cromosómico y no se integra en el ADN cromosómico de la levadura. Células sin transformar y transformadas con pYAC_MEM crecidas en presencia de Top2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos, se aislaron las formas replicativas y digirieron en presencia de *BamHI* y *PvuI*. Las mismas muestras se corrieron en otro gel y se detectaron con sondas distintas. La inmunodetección de la izquierda corresponde a la obtenida con la sonda L1, que hibridó exclusivamente con pYAC-MEM. En cambio, a la derecha se muestra la inmunodetección con la sonda URA3 que además de detectar pYAC_MEM también hibridó con el genómico de la levadura. Las bandas detectadas con la sonda URA3 que corresponden al ADN cromosómico de la levadura se señalan con un *.

4.2.5 Análisis de la iniciación, progresión y terminación de la replicación de YAC_MEM mediante electroforesis bidimensional.

Con el fin de identificar si existían diferencias en la replicación de las formas circular y lineal del minicromosoma, nos propusimos analizar los IsR de YAC_MEM y compararlos con los obtenidos con pYAC_MEM luego de su digestión con *BamHI*.

Como ya se ha descrito anteriormente, para la obtención del YAC_MEM se digirió pYAC_MEM con la enzima de restricción *BamHI*, lo que libera el fragmento lineal dejando expuestas las repeticiones teloméricas. El estudio comparativo que se

muestra a continuación corresponde al fragmento pYAC_MEM *BamHI-BamHI* y YAC_MEM que contienen los mismos elementos.

La inmunodetección de YAC_MEM (Figura 30B) se muestra acompañada de un diagrama interpretativo en donde el color verde corresponde al arco de Y simples, el rojo al arco de burbujas y el magenta el arco de recombinantes. Los IsR correspondientes al minicromosoma lineal generaron dos patrones de replicación distintos. La detección de un arco de burbujas prácticamente completa indica una iniciación de la replicación en el elemento ARS4 tal como aparece simulado en el panel(i); mientras que la detección de un arco de Y simples completo (ii) sugirió la iniciación de la replicación en uno de los telómeros lo que determinaría una replicación unidireccional desde un extremo al otro del cromosoma lineal,

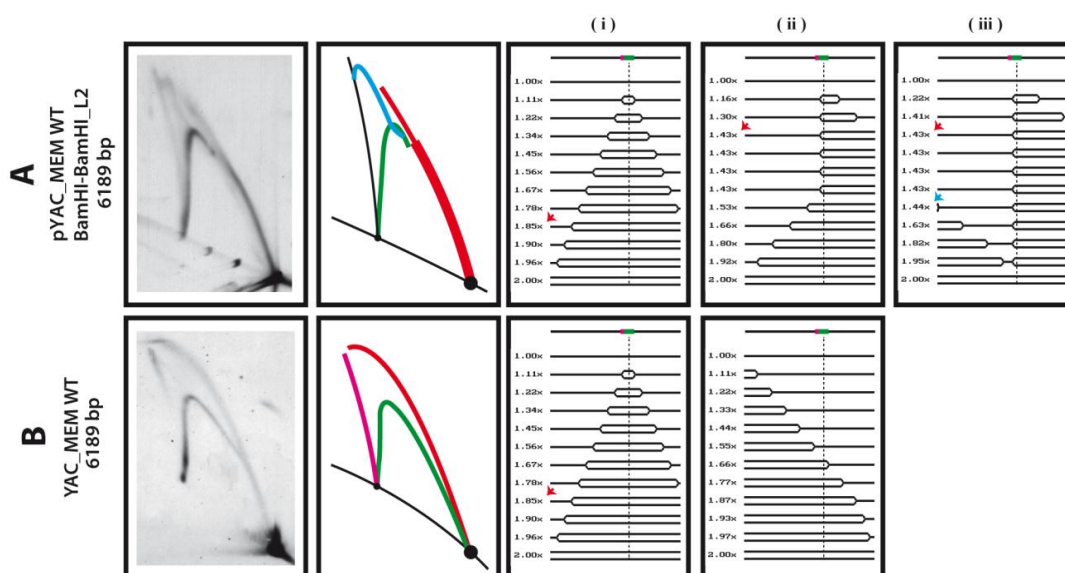


Figura 30. Estudio de los IsR del fragmento *BamHI-BamHI* del minicromosoma circular pYAC_MEM y del minicromosoma lineal YAC_MEM. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM y YAC_MEM crecidas en presencia de Top2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos y se aislaron las formas replicativas correspondientes. **A.** IsR de replicación del fragmento *BamHI-BamHI* de pYAC_MEM. **B.** IsR de replicación de YAC_MEM no digeridos. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los IsR detectados con la sonda L2. A su derecha se muestran sus respectivos esquemas interpretativos. En los paneles siguientes (i,ii,iii) se muestran los IsR esperados simulados mediante el programa 2DGels.

4.3 Estudio del ciclo celular de células de *S. cerevisiae* transformadas con minicromosomas circulares y lineales .

Teniendo en cuenta los perfiles obtenidos por citometría de flujo, se decidió utilizar 40 minutos para estudiar la replicación y 80 minutos para analizar la segregación en ambos minicromosomas artificiales.

Las inmunodetecciones de las muestras intactas de pYAC_MEM a los 40 minutos (Figura 31) se detectaron utilizando la sonda L2. En la muestra con niveles silvestres de Top2, pYAC_MEM WT (Figura 31A), se visualizaron las formas monoméricas así como el arco de intermediarios de replicación. Además se observó un rastro de encadenados que por su movilidad electroforética podría corresponder a Cat As. En contraposición a lo observado para pYAC_MEM en células con niveles WT de Top2, cuando las células fueron crecidas en ausencia de esta topoisomerasa se detectó la presencia de distintas especies de moléculas encadenadas: Cat Cs, Cat Bs y Cat As, (Figura 31B).

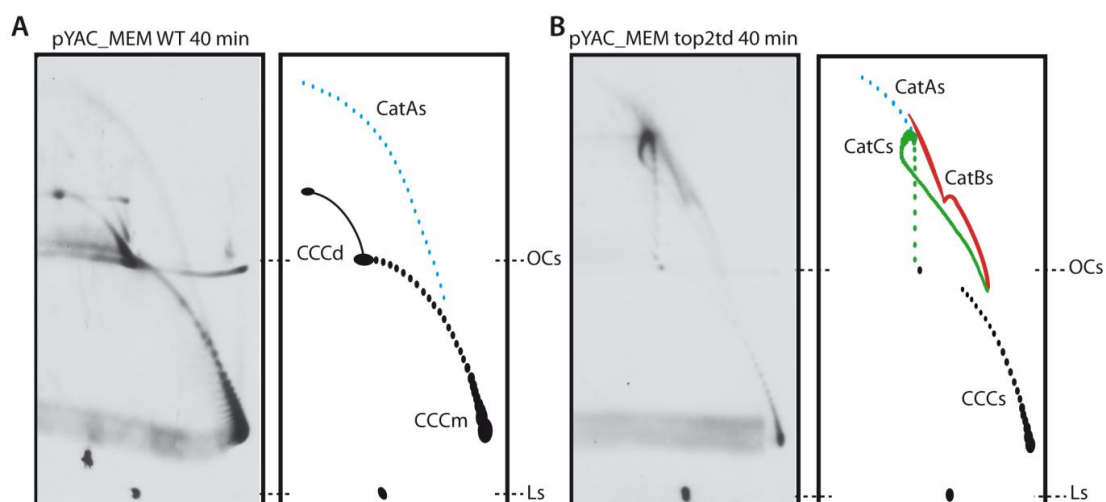


Figura 31. Análisis de la movilidad electroforética del ADN de pYAC_MEM durante la fase de replicación en células top2-td crecidas en presencia y en ausencia de Top2. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron las células de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células a los 40 minutos y se aisló su ADN. **A.** Inmunodetección de la muestra intacta en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra intacta en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema representativo correspondiente, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los encadenados Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

Para confirmar la naturaleza de las distintas formas topológicas observadas, las muestras intactas se trataron con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla Nt.Bpu10I, y posteriormente se analizaron por electroforesis bidimensional. En la muestra con niveles silvestres de Top2 (Figura 32A) no se detectaron moléculas encadenadas en contraposición a la muestra con la Top2 degradada (Figura 32B) en la que la presencia de la señal correspondiente a Cat As era evidente. En casos la desaparición de la señal correspondiente a las formas CCCs monoméricas y su transformación a formas relajadas, OCs, sirvió como un control interno de la completa digestión por la endonucleasa.

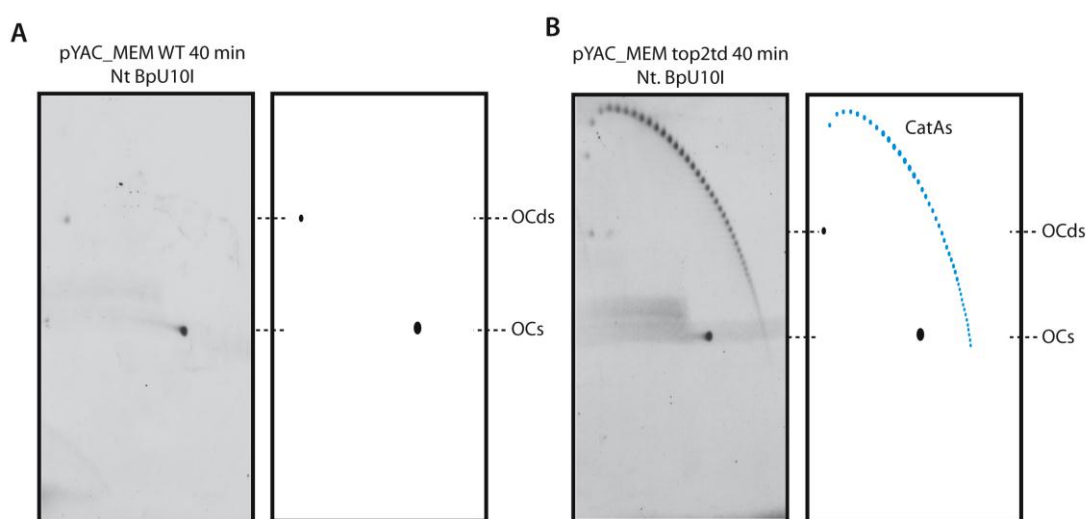


Figura 32. Resolución y acumulación de encadenados de pYAC_MEM en células top2-td crecidas en presencia y en ausencia de Top2. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células a los 40 minutos, se aisló el ADN y se trató con la endonucleasa de cadena sencilla Nt Bpu10I. **A.** Inmunodetección de la muestra correspondiente a células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra correspondiente a células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema interpretativo correspondiente, en color negro se observan las señales de las formas no replicadas y en azul claro los encadenados Cat A.

Para comprobar la necesidad de Top2 para la correcta segregación de las cromátidas hermanas, se analizaron las muestras correspondientes a 80 minutos después de la liberación del bloque con alfa factor. Se muestran las inmunodetecciones de células top2-td transformadas con pYAC_MEM (Figura 33) crecidas en presencia y en ausencia de Top2 y recogidas a los 80 minutos (Figura 25). En la muestra con niveles silvestres de Top2 (Figura 33A) sólo aparecen formas monoméricas, no se observó

ningún rastro de encadenados, mientras que en la muestra intacta crecida en ausencia de Top2 (Figura 33B) se mantuvieron los encadenados detectados después de la replicación.

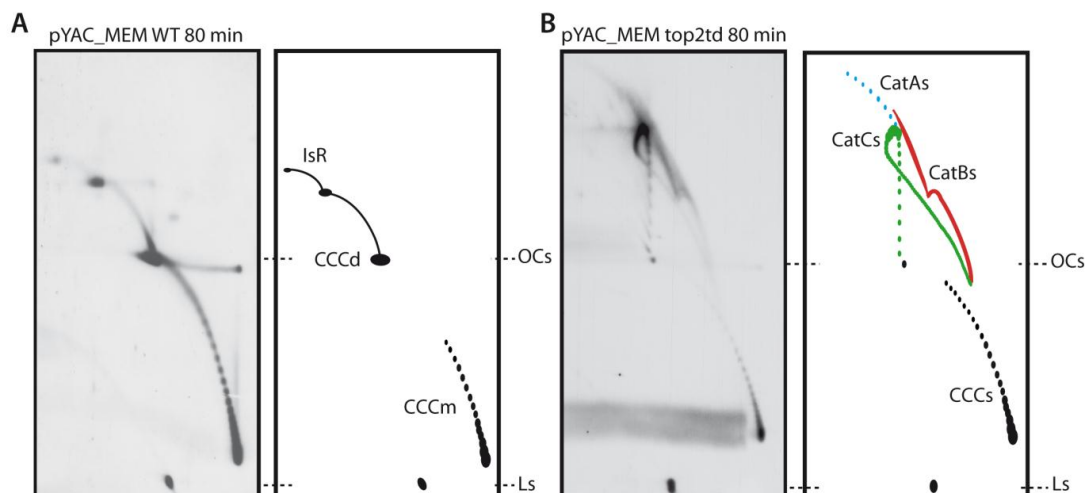


Figura 33. Imposibilidad de segregación de las cromátidas hermanas en células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en ausencia de Top2. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células a los 80 minutos y se aisló el ADN. **A.** Inmunodetección de la muestra intacta aislada de células crecidas en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra intacta de células crecidas en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema interpretativo correspondiente, en color negro se indican las señales de las formas no replicadas y en color verde, rojo y azul claro, los encadenados Cat Cs, Cat Bs y Cat As, respectivamente.

Para confirmar los resultados obtenidos se digirieron las muestras con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla Nt. BpU10I (Figura 34). La eliminación del superenrollamiento convierte a los encadenados Cat Cs y Cat Bs de la muestra correspondiente a células crecidas en ausencia de Top2 en formas relajadas: Cat As. De la misma forma anteriormente mencionada, en ambos casos la desaparición de las formas monoméricas superenrolladas sirvieron como control de la digestión.

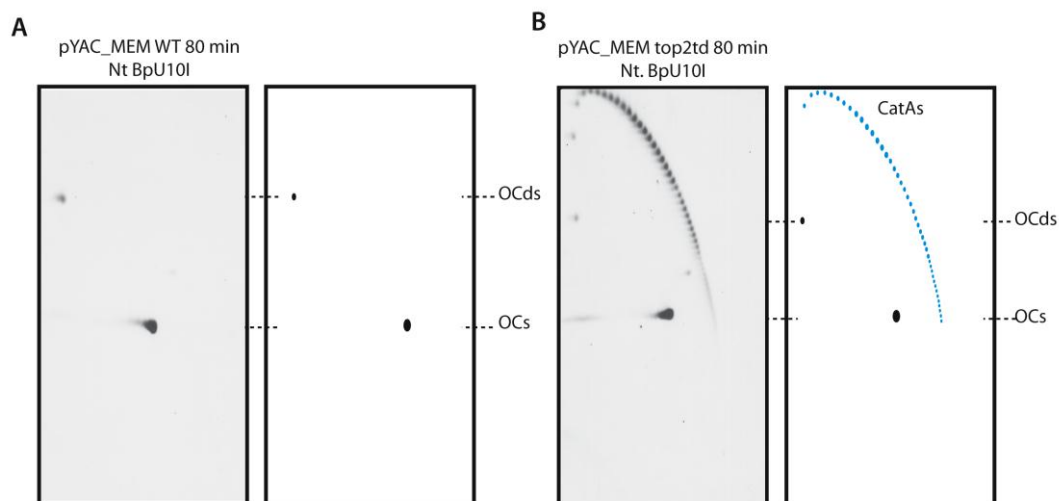


Figura 34. Confirmación de la persistencia de encadenados en células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en ausencia de Top2. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células a los 80 minutos, se aisló el ADN y se lo digirió con la endonucleasa de cadena sencilla Nt BpU10I. **A.** Inmunodetección de la muestra de células crecidas en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra de células crecidas en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema interpretativo correspondiente, en color negro se observan las señales de las formas no replicadas y en azul claro los encadenados Cat A.

Los resultados obtenidos confirmaron que la Top2 es indispensable para la segregación de los cromosomas circulares.

4.3.1 Estudio de la topología de YAC_MEM durante la replicación y la segregación celular en presencia y en ausencia de Top2.

A la vista de la incapacidad del minicromosoma circular a la hora de segregar en ausencia de Top2 quisimos averiguar si el cromosoma lineal se comporta de la misma forma. Para ello se abordó el estudio de células transformadas con el minicromosoma lineal de la misma forma en que se estudiaron células transformadas con el minicromosoma circular

El estudio de las muestras recogidas a los 40 minutos por electroforesis bidimensional (Figura 35), nos reveló una imagen totalmente distinta a la registrada en el caso del minicromosoma circular. Se apreció la presencia de señales correspondientes a intermediarios de replicación, IsR, una burbuja y una Y simple, ambas completas e

iguales en ambas muestras, independientemente de la presencia o ausencia de Top2. Además, en la muestra silvestre, se observó la presencia del arco de recombinantes.

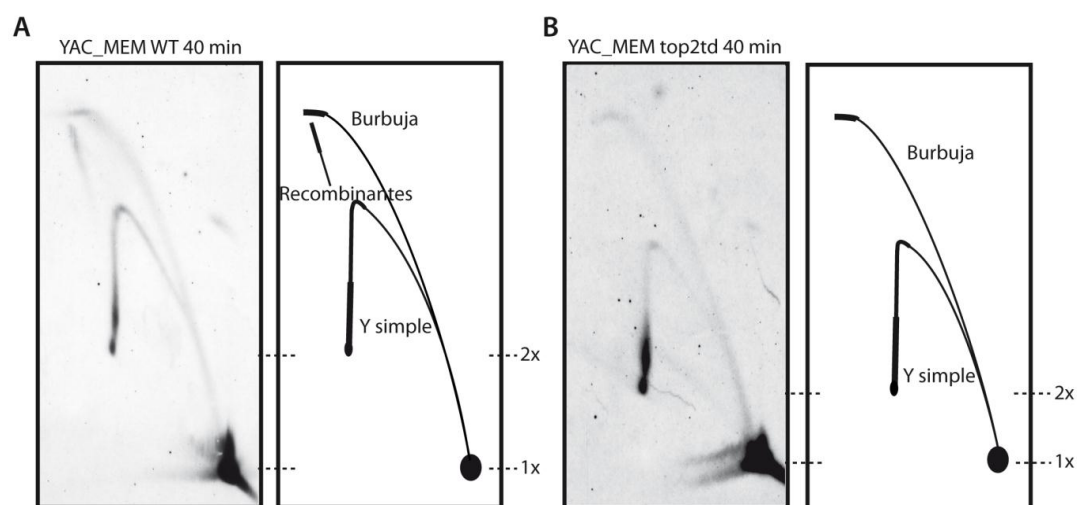


Figura 35. Ausencia de encadenados del cromosoma lineal al final de la replicación en ausencia de Top2. Células top2-td transformadas con YAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron las células a los 80 minutos y se aisló el ADN. **A.** Inmunodetección de la muestra intacta de células crecidas en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra intacta de células crecidas en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema interpretativo correspondiente.

Los patrones de IsR obtenidos en los geles bidimensionales confirmaron que al igual que en el caso del minicromosoma circular, la replicación del cromosoma lineal no estaba afectada por la degradación de la Top2

Para el estudio de la segregación cromosómica se recogieron células YAC_MEM top2-td a los 80 minutos en presencia y en ausencia de Top2, tiempo que corresponde con la mitosis celular (Figura 25). En las inmunodetecciones (Figura 36) se observó la presencia de una única señal, exactamente igual en ambas condiciones de crecimiento celular, correspondiente al 1x del cromosoma lineal estudiado. Ya se observaron intermediarios de replicación, solo moléculas lineales, indicando que la replicación finalizó con normalidad y la segregación del cromosoma lineal tuvo lugar correctamente.

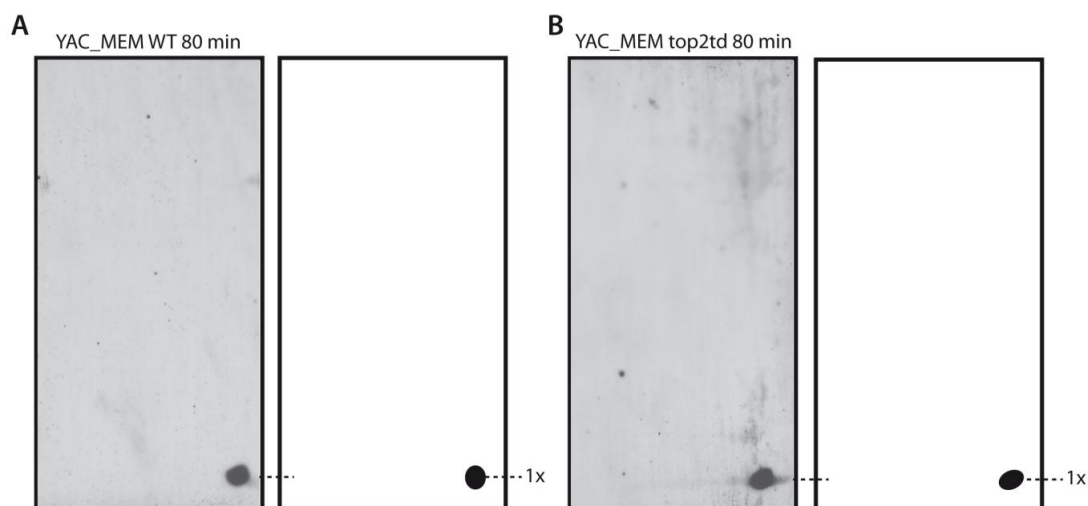


Figura 36. La ausencia de topología del cromosoma lineal permite la correcta segregación de las cromátidas hermanas en ausencia de Top2. Células YAC_MEM top2-td en crecimiento exponencial se bloquearon con alfa factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron las células de forma sincrónica en ausencia y en presencia de Top2. Se recogieron células a los 80 minutos, se aisló el ADN. **A.** Inmunodetección de la muestra intacta de las células YAC_MEM top2-td crecidas en presencia de Top2. **B.** Inmunodetección de la muestra intacta de las células YAC_MEM top2-td crecidas en ausencia de Top2. A la derecha de cada una de las inmunodetecciones se muestra el esquema interpretativo.

Los resultados obtenidos demuestran que el cromosoma lineal disipó toda su tensión torsional por los telómeros siendo capaz de segregar correctamente en ausencia de Top2. En contraposición a lo que ocurrió en el cromosoma circular, el cual se acumuló en mitosis en forma de encadenados impidiendo su segregación.

4.4 Análisis de la replicación durante la diferenciación terminal de células MEL

La replicación de los genomas eucariotas se lleva a cabo a partir de la activación de numerosos orígenes de replicación distribuidos a lo largo de los cromosomas. Los orígenes se activan asincrónicamente durante la fase S del ciclo celular. La síntesis de ADN progresa bidireccionalmente desde cada origen y se detiene cuando las horquillas de replicación convergen (Gilbert, 2004, Hamlin, 2008). Este proceso sigue un complejo programa espacial y temporal que se encuentra bajo el control de mecanismos epigenéticos y que está fuertemente ligado a la organización funcional del núcleo (Mechali 2001; Anglana, Apiou et al. 2003).

El control de la iniciación y la progresión de la síntesis de ADN en células en proliferación ha sido objeto de numerosos estudios (Schubeler, Scalzo et al. 2002; MacAlpine, Rodriguez et al. 2004; Hansen, Thomas et al. 2010). Por el contrario, cómo ocurre el cese de la replicación a medida que las células abandonan el ciclo celular y se diferencian ha recibido escasa atención.

La diferenciación *in vitro* de las células eritroleucémicas MEL es un modelo celular adecuado para el estudio de la replicación durante la reprogramación de células tumorales hacia la diferenciación y la división terminal. Bajo la acción de agentes químicos como el HMBA, las células reinician el proceso de diferenciación hacia el linaje eritroide. Cuando se expone un cultivo de células MEL a un tratamiento con un agente inductor como el HMBA las células continúan proliferando durante al menos 4 o 5 ciclos antes de detenerse y acumularse definitivamente en G1 (Friedman and Schildkraut 1977; Marks, Richon et al. 1994). Este proceso se desarrolla de forma gradual como hemos corroborado en los experimentos que se describen en los siguientes apartados.

4.4.1 Cinética de la diferenciación de células MEL tratadas con HMBA

El HMBA es el agente químico utilizado rutinariamente en el laboratorio para inducir la diferenciación de células MEL. Para determinar el número de células diferenciadas a lo largo del proceso de diferenciación se analizaron tres cultivos independientes de células MEL en crecimiento exponencial (2×10^5) en ausencia o presencia de 5 mM de HMBA. Se tomaron muestras cada 24 horas y se contabilizó el porcentaje de células diferenciadas por medio del ensayo de benzidina. La benzidina reacciona con los grupos hemo de la hemoglobina produciendo una coloración azul en células diferenciadas distinguible fácilmente al microscopio óptico. En la Figura 37A, se muestran ejemplos de cultivos de células MEL no tratadas (0 horas) o tratadas con HMBA durante 48, 96 y 120 horas. El incremento en el porcentaje de diferenciación se vio acompañado además por cambios morfológicos característicos de las últimas etapas de la diferenciación de las líneas eritroides como son: la disminución en el tamaño celular, la presencia de núcleos más densos y una menor relación núcleo/citoplasma.

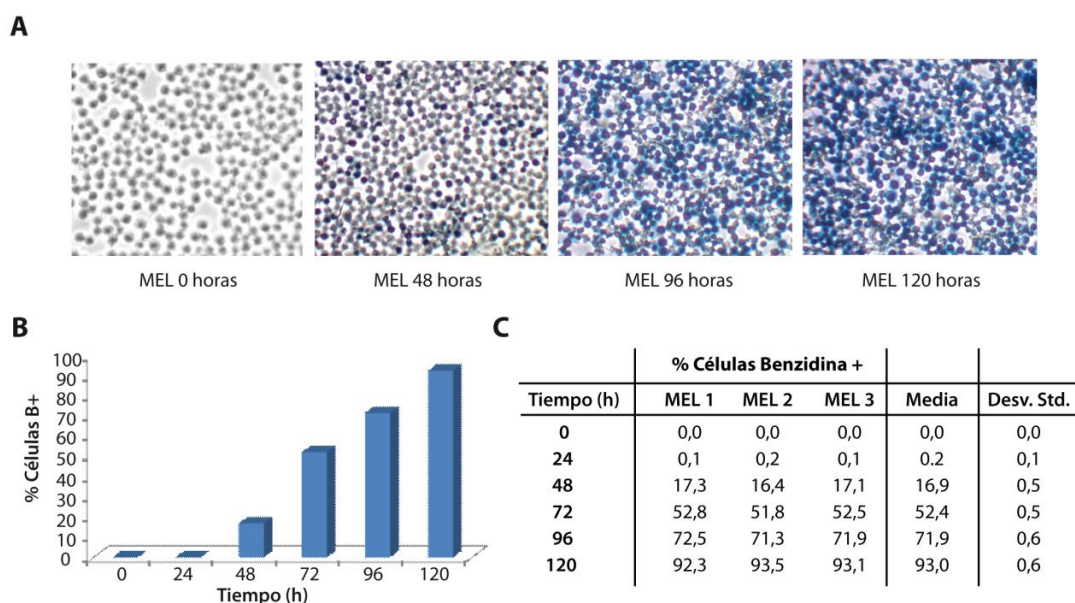


Figura 37. Detección de células MEL diferenciadas. Se mantuvieron 3 cultivos independientes con HMBA 5 mM a lo largo de 120 horas. Cada 24 horas se contabilizó el número de células B+ utilizando el ensayo de benzidina. A. Tratamiento con benzidina de células MEL, tomando muestras a las 0 horas, 48 horas, 96 horas y 120 horas. Las fotografías se tomaron en campo claro utilizando un microscopio óptico a un aumento de 40x. B. Porcentaje de diferenciación de células MEL a lo largo del tratamiento con HMBA. Se contabilizó el número de células azules (B+) frente al número de células no coloreadas. C. Porcentaje de células MEL diferenciadas incluyendo la media y la desviación estándar obtenidas en cada caso.

Las Figuras 37B y C corresponden a los porcentajes de células diferenciadas obtenidos mediante el ensayo de benzidina. El porcentaje de diferenciación espontánea del cultivo de 0 horas fue menor del 1%. No se observó un incremento significativo del porcentaje de células diferenciadas durante las primeras 24 horas, intervalo que coincide con la fase de predeterminación, en la cual no se observan aún las características del fenotipo eritroide. A partir de las 48 horas de tratamiento, el porcentaje de células diferenciadas aumentó significativamente hasta alcanzar más del 90% a las 120 horas de tratamiento (Figuras 37B y C. Estos resultados coinciden mayoritariamente con los datos obtenidos anteriormente en nuestro y en otros laboratorios en donde se han utilizado diferentes clones derivados de células MEL (Rekhtman, Radparvar et al. 1999; Vanegas, García-Sacristán et al. 2003; Fernández-Nestosa, Hernández et al. 2008).

4.4.2 Análisis de la dinámica de replicación durante la diferenciación de las células MEL

Durante los últimos veinte años se ha desarrollado una amplia variedad de métodos que permiten mapear orígenes de replicación en células eucariotas (DePamphilis 1997). La utilización de estas técnicas ha permitido demostrar que los genomas eucarióticos contienen un exceso de orígenes de replicación potenciales y que sólo una fracción de los mismos se activa en la fase S de cada ciclo celular. Como ya se ha mencionado, la dinámica de la replicación del ADN en células que han salido del ciclo celular ha sido objeto de estudio en escasas ocasiones y por ello, el modo de activación o desactivación de los orígenes junto a otros parámetros de la replicación durante la diferenciación es relativamente desconocido.

Con el objeto de analizar la dinámica a lo largo de la diferenciación terminal de células MEL se han utilizado dos abordajes distintos: la citometría de flujo para analizar los cambios que se producen en las distintas fases del ciclo celular y la técnica del *ADN combing* para determinar distintos parámetros de la replicación en fibras individualizadas de ADN.

4.4.2.1 Distribución de las fases del ciclo celular durante la diferenciación

En etapas avanzadas de la diferenciación de distintos tipos celulares de mamíferos se observa un contenido de ADN correspondiente a las fases G1 o G0 del ciclo celular (Prescott 1976). Se ha visto previamente que las células MEL cultivadas en presencia de HMBA se acumulan en la fase G1 después de cuatro o cinco rondas de replicación (Friedman and Schildkraut 1977; Marks, Richon et al. 1994). Con el propósito de corroborar estos resultados se llevó a cabo una serie de experimentos que permitieron analizar los patrones de ciclo utilizando la citometría de flujo de células teñidas con ioduro de propidio (IP). Se partió de cultivos de células MEL sin tratar o tratados con HMBA tomando muestras cada 24 horas a lo largo de 96 horas. Como se muestra en la Figura 38, la distribución correspondiente a las fases G1, S y G2/M de células MEL varía según el tiempo de exposición al HMBA. El perfil que presentaron las células a las 0 y 24 horas de tratamiento muestra una distribución característica de estados proliferativos. A partir de las 48 horas se observó una gradual acumulación de células en la fase G1, haciéndose más patente en las muestras de 72 y 96 horas. Estos resultados demostraron que a tiempos largos de tratamientos con HMBA se produce un movimiento de las células de los compartimentos de S y G2/M hacia G1. Estos tiempos coinciden con las etapas en donde se observa un incremento en el porcentaje de células hemoglobinizadas (Figura 37) y que corresponden por lo tanto a células diferenciadas.

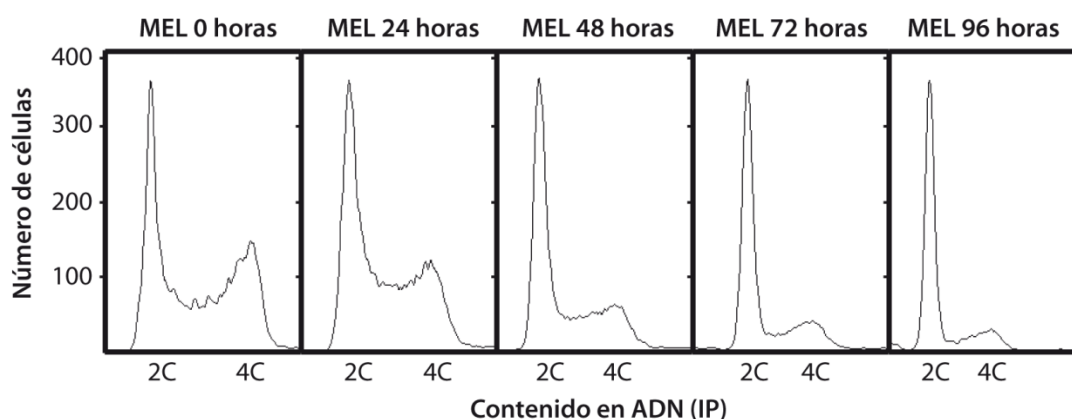


Figura 38. Parada del ciclo celular en fase G1 a lo largo de la diferenciación. Células MEL crecidas en ausencia y en presencia de HMBA se fijaron con etanol, se trataron con ioduro de propidio (IP) y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran los perfiles de distribución celular en las diferentes fases del ciclo, recogiendo muestras cada 24 horas del inicio del tratamiento con HMBA.

Con el objeto de analizar los cambios que se producen en la fase S del ciclo celular durante la diferenciación de las células MEL, se suministró un pulso de 20 minutos con bromodeuxiridina (BrdU) a cultivos creciendo en ausencia o presencia de HMBA. El BrdU se incorpora al ADN durante la replicación lo que permite identificar exclusivamente células en fase S durante el tiempo de marcaje (Khochbin, 1988). Posteriormente, las muestras se analizaron por citometría de flujo y se identificaron las distintas fases del ciclo celular al mismo tiempo que se detectaba la presencia o ausencia de BrdU.

En los siguientes experimentos se utilizaron células no tratadas (0 horas) o tratadas durante 24 o 48 horas con 5mM de HMBA. A tiempos más largos las células dejan de replicar y por lo tanto no es posible su detección mediante BrdU. El umbral de separación entre células positivas y negativas se estableció mediante la muestra control sin exposición a BrdU. Tal como se representa en la Figura 39 el número de células en etapas iniciales de la diferenciación positivas a BrdU fue menor que el de células no tratadas, disminuyendo progresivamente desde el 65,13% a las 0 horas hasta el 42,73% a las 24 horas y el 32,48% a las 48 horas de tratamiento con HMBA. El número de células en G2/M disminuyó también desde el 22,23% al 17,28% y 15,09%, respectivamente. Por el contrario, el número de células en G1 aumentó progresivamente desde el 10,64% al 36,41% y 48,33%, respectivamente. En la Figura 39B se muestran dos gráficos independientes que representan las células positivas y negativas al marcaje con BrdU de izquierda a derecha, respectivamente. Se observa que las células correspondientes a la muestra de 0 horas se distribuyen homogéneamente en toda la fase S del ciclo celular. Sin embargo, a las 24 y 48 horas comienzan a acumularse al final del S, indicando la falta de entrada de células desde G1 como consecuencia de su acumulación. Este mismo efecto se puede apreciar en el gráfico de la derecha, en el perfil de células no marcadas con BrdU, en el que conforme avanza la diferenciación se observa la disminución del pico de la fase G2/M.

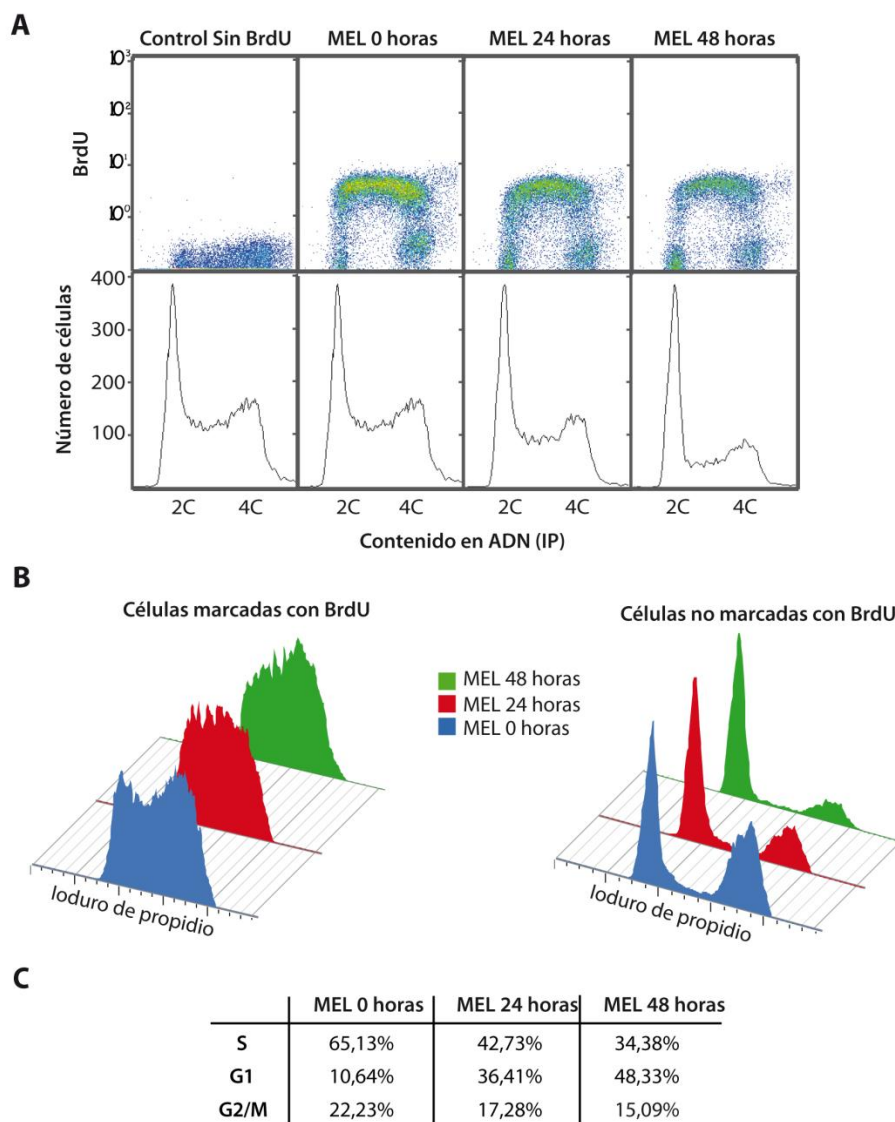


Figura 39. Distribución de células MEL marcadas con BrdU y IP durante las primeras fases de la diferenciación. Células MEL crecidas en ausencia y en presencia de HMBA se fijaron con etanol, trataron con BrdU e IP y se analizaron mediante citometría de flujo. **A.** El panel de la izquierda superior corresponde a la muestra control sin BrdU utilizada para fijar el umbral a partir del cual podemos considerar positivas las células. Se tomaron muestras cada 24 horas del comienzo del tratamiento con HMBA y se representaron en función de su contenido en ADN (IP) frente a la incorporación de BrdU. **B.** El gráfico de la izquierda muestra el perfil del IP de las células positivas a BrdU, por encima del umbral establecido por la muestra control, a los diferentes tiempos de diferenciación. El gráfico de la derecha representa el perfil de IP de las células negativas a BrdU, por debajo del umbral establecido por la muestra control, a los diferentes tiempos de tratamiento con HMBA. **C.** Porcentaje de células en cada fase del ciclo, G1, S y G2/M.

Estos resultados han permitido confirmar que las células se acumulan en la fase G1 a medida que avanza la diferenciación. Por otra parte, la incorporación diferencial de BrdU sugiere que se producen cambios dentro de la fase de replicación conforme las células avanzan hacia su diferenciación terminal.

4.4.2.2 Estudio de la replicación durante la diferenciación mediante el *ADN combing*

La secuenciación del genoma humano inauguró una nueva era en la genética fundamental y aplicada que paulatinamente fue ampliándose con nuevas tecnologías que permiten llevar a cabo un análisis masivo de los genomas. Una de estas técnicas, el *ADN combing* ofrece una nueva perspectiva sobre la estructura y dinámica del genoma con una resolución que va desde varias kilobases hasta una megabase. Originalmente se desarrolló para estudiar los reordenamientos genéticos y mapear genes. Los recientes avances han ampliado el espectro de sus aplicaciones para estudiar la dinámica de la replicación del genoma a tiempo real (Herrick and Bensimon 2009).

A la hora de utilizar el *ADN combing* se ha tenido especial cuidado al seleccionar las moléculas con el fin de asegurar que los datos correspondan a las condiciones de marcaje establecidas inicialmente e impedir falsos positivos. En la Figura 4A se muestran algunos ejemplos de imágenes de fibras de ADN obtenidas con un microscopio de fluorescencia. La Figura 40B representa moléculas de ADN marcadas a distintos momentos de la replicación. En letras minúsculas se asocian las ilustraciones con los segmentos marcados de las moléculas mostradas en las imágenes de la Figura 40A. Las horquillas de replicación se pueden detectar desde el inicio de la replicación (b) o una vez comenzada la misma (a). Un nuevo origen se activa durante el tiempo de marcaje del segundo pulso (c). Dos orígenes activos y consecutivos convergen en un mismo fragmento de CldU (d). El segmento de IdU individualizado nos indica el final de la replicación de una horquilla (e).

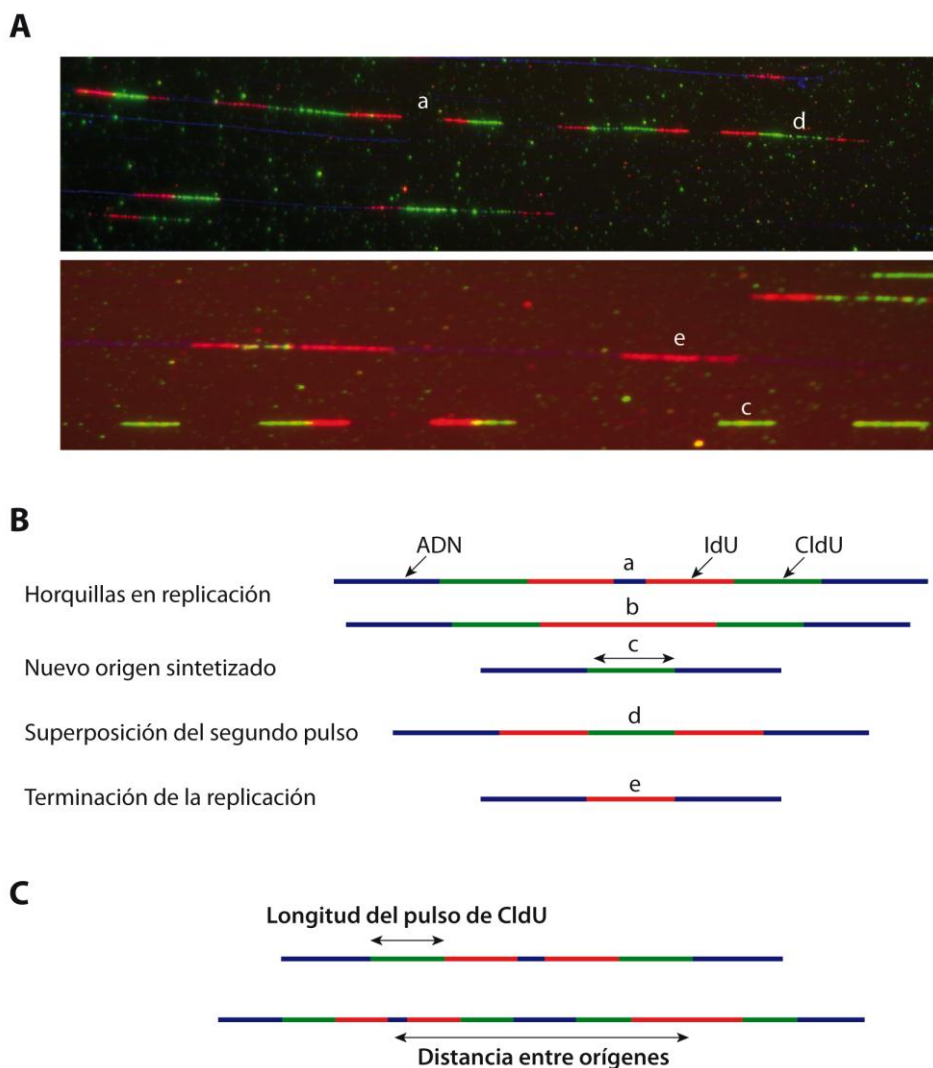


Figura 40. Visualización de fibras de ADN mediante la técnica de *ADN combing*. Células MEL crecidas en ausencia y en presencia de HMBA en crecimiento asincrónico se sometieron a un pulso durante 20 minutos con IdU y CldU consecutivamente. Las fibras de ADN se alinearon y estiraron en cubres previamente silanizados. Los nucleótidos halogenados incorporados se visualizaron mediante inmunotinción y microscopia de fluorescencia. **A.** Imágenes de ejemplos de fibras obtenidas mediante la técnica del *ADN combing* con el microscopio de fluorescencia. En rojo se observa el marcaje con IdU, en verde el CldU y en azul la fibra de ADN. **B.** Ilustraciones esquemáticas de los resultados esperados. **C.** Ilustración de la medición de la longitud del pulso de CldU y la distancia entre dos orígenes activos y consecutivos, en dos fibras que cumplen los requisitos para su evaluación.

Para estudiar la velocidad de avance de las horquillas sólo se eligieron aquellas moléculas en las que el pulso de clordeuxiridina, CldU, en color verde, es consecutivo a un pulso de iododeuxiridina, IdU, en color rojo, y por el lado contrario a la fibra de ADN, en color azul (Figura 40C). De esta forma se asegura que el tamaño del segmento detectado en color verde corresponde a los 20 minutos del pulso con CldU.

Para analizar la distancia entre orígenes activos se seleccionaron moléculas que tuvieran al menos dos segmentos independientes de IdU, en rojo, flanqueados a ambos lados por señales de CldU, en verde. De esta manera se asegura que las horquillas progresan desde un mismo punto de forma bidireccional. La distancia entre orígenes activos se midió desde y hasta el punto medio de cada fragmento de IdU (Figura 40C). Se obtuvo la distancia en kb según una fórmula establecida multiplicando la distancia medida en píxeles por la constante 0,34 (Poveda et al. 2007) en imágenes realizadas en un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 40 aumentos.

4.4.2.2.1 Análisis de la tasa de progresión de las horquillas de replicación

Para medir la tasa de progresión de las horquillas se partió de cultivos de células en crecimiento exponencial en ausencia o presencia de HMBA, desde un estado proliferativo a las 0 horas hasta las primeras fases de la diferenciación terminal a las 48 horas. Se procesaron las células siguiendo los protocolos para el *ADN combing* y se obtuvieron fibras de cromatina extendidas sobre cubreobjetos. Después de valorar distintos tiempos de marcaje, entre 10 a 40 minutos en intervalos de 10 minutos, se decidió elegir 20 minutos como el tiempo óptimo para analizar las potenciales diferencias entre la replicación de células en proliferación y diferenciación. De forma similar a como se procedió en el apartado anterior se suministró dos pulsos consecutivos de 20 minutos con IdU y CldU, respectivamente a cultivos asincrónicos de células a diferentes tiempos de diferenciación.

En la figura 41A se muestra una selección de moléculas del tamaño del segmento de CldU, en color verde. En las Figuras 41B y C se muestran los datos del estudio expresados en porcentaje. Entre las moléculas marcadas con CldU, el intervalo más abundante de la muestra de 0 horas, con el 26% (62 moléculas de un total de 243) fue el comprendido entre 30-40 kb. A medida que la diferenciación avanza los intervalos más frecuentes corresponden a tamaños menores. En la muestra de 24 horas el intervalo más abundante con el 22% fue de 20-30 kb (59 moléculas de un total de 273) y en la de 48 horas con el 39% de las moléculas, la distancia más frecuente fue la comprendida entre 10-20 kb (110 moléculas de un total de 285). El análisis estadístico

de los datos se realizó mediante el test de *Mann-Whitney*, una prueba no paramétrica que tiene en cuenta el valor de la mediana en lugar del de la media. De esta manera, se pueden comparar dos muestras independientes obteniendo valores *P* menores de 0,01 en todos los casos y asegurar así que los datos son significativamente diferentes y las muestras comparables entre si. Todas las muestras analizadas en este apartado fueron significativamente diferentes obteniendo valores de *P* inferiores a 0,001.

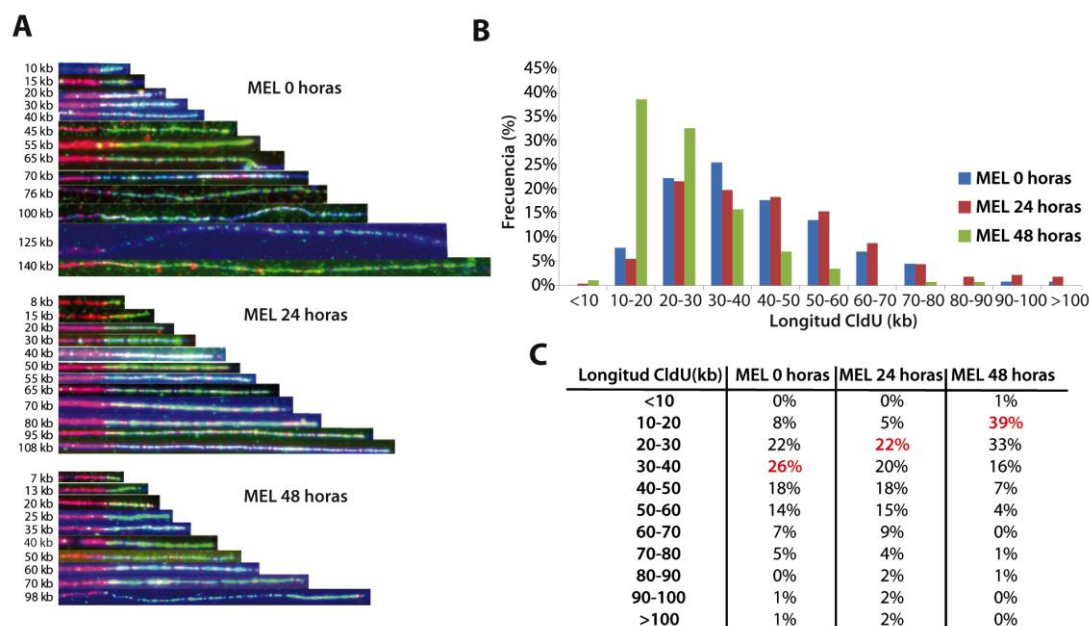


Figura 41. Tasa de replicación de las horquillas durante la diferenciación de las células MEL. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de HMBA se sometieron a pulsos consecutivos con IdU y CldU durante 20 minutos respectivamente. Las moléculas de ADN se estiraron según la técnica del *ADN Combing*. Las fibras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas y aleatorias de fibras de ADN colocadas de menor a mayor longitud del segmento generado por el pulso de CldU. En color rojo se observa el pulso de IdU, en verde el de CldU y en azul la fibra de ADN no marcada. **B.** Distribución de los marcajes de CldU, agrupados en intervalos de 10 kb, en función de la frecuencia obtenida para cada intervalo durante el periodo de predeterminación y determinación de la diferenciación de las células MEL, tomando muestras cada 24 horas. En el análisis estadístico realizado por el test de *Mann Whytney* el *P* valor siempre es <0,001. **C.** Porcentaje de moléculas en cada intervalo.

Estos resultados demostraron que el número de moléculas con segmentos marcados de mayor longitud disminuían con los tiempos de tratamiento. Por lo tanto, se puede deducir que el progreso de las horquillas de replicación decrece conforme las células avanzan hacia la diferenciación terminal.

4.4.2.2.2 Análisis de la distancia entre orígenes activos

El estudio de la distancia entre orígenes activos se llevó a cabo sobre las mismas preparaciones utilizadas para analizar la progresión de las horquillas de replicación, según se describe en el apartado anterior. En la figura 42A se muestra una serie de moléculas que cumplían con los requisitos descritos en la figura 40C y que por lo tanto fueron seleccionadas para analizar la distancia entre orígenes activos. Los datos obtenidos expresados en porcentaje se muestran en el gráfico y en la tabla de las Figuras 42B y C. Tal como se deduce de los resultados se observó una disminución en la distancia entre orígenes activos conforme aumenta el tiempo de tratamiento con HMBA y las células se diferencian, reduciéndose casi a la mitad la distancia media en las muestras de 48 horas. El valor más frecuente entre dos orígenes consecutivos en la muestra de 0 horas fue de 80-100 kb con el 18% del total de fibras analizadas (29 moléculas de un total de 159). En la muestra de 24 horas el intervalo más abundante correspondió a la distancia comprendida entre 60-80 kb con el 18% (29 moléculas de un total de 161) y a las 48 horas con un 32% del total de fibras estudiadas el intervalo más frecuente fue el de 40-60 kb (78 moléculas de un total de 247). El total de eventos iniciados por megabase de ADN fue de 1,39 para MEL 0 horas, 1,40 para MEL 24 horas y 2.10 para MEL 48 horas. En el análisis estadístico mediante el test de *Mann-Whitney* se obtuvo un valor de P inferior al 0,001 en todos los casos, demostrando que los datos son significativamente diferentes y las muestras analizadas comparables entre sí.

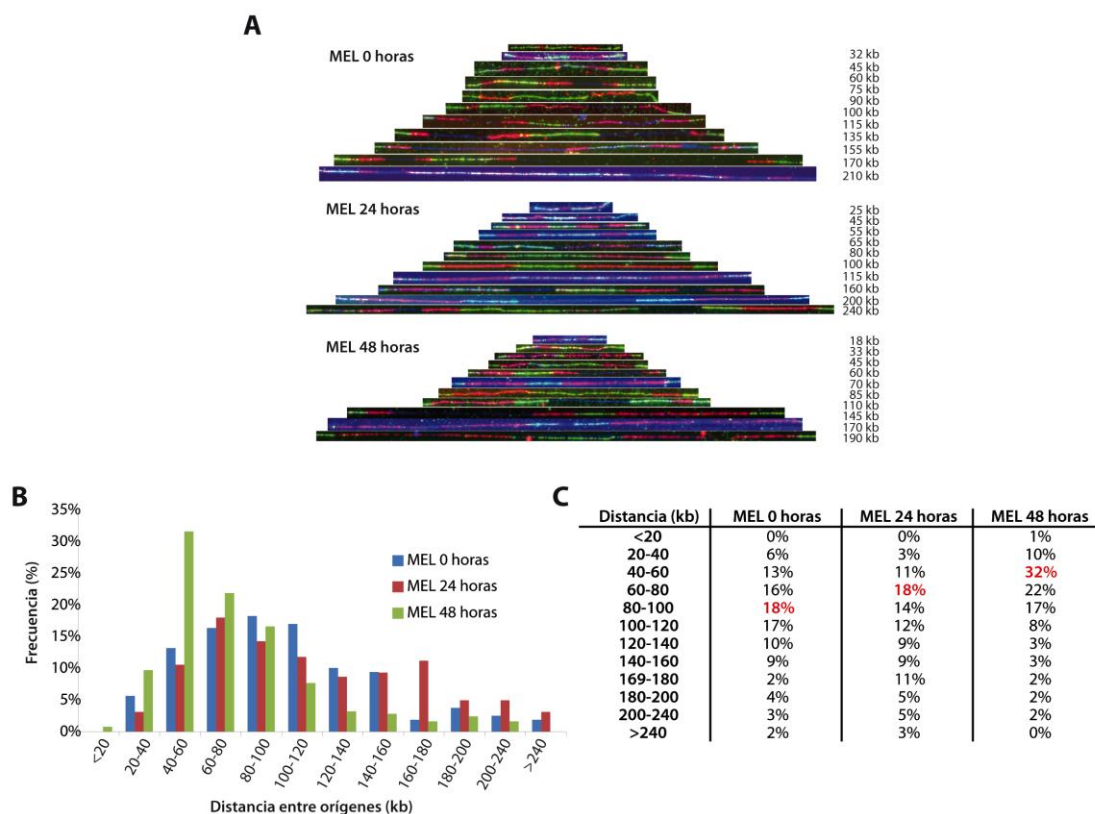


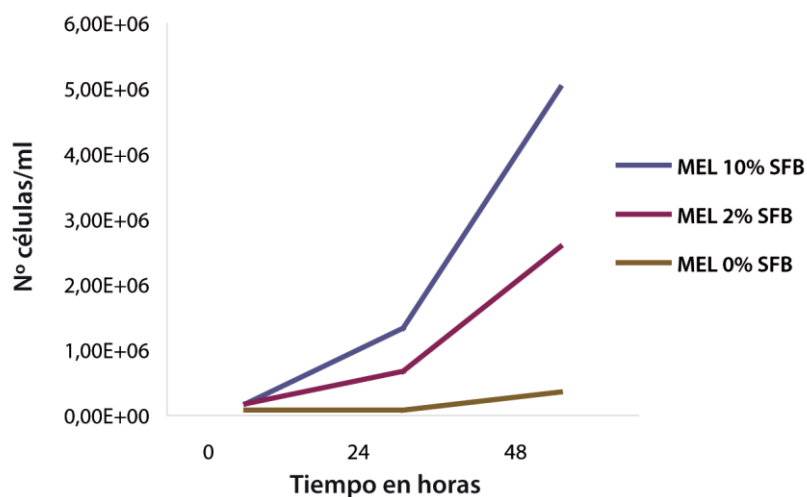
Figura 42. Distancia entre orígenes activos durante la diferenciación de las células MEL. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de HMBA 5mM fueron sometidas a pulsos consecutivos con IdU y CldU durante 20 minutos respectivamente. Las moléculas de ADN se estiraron según la técnica del *ADN Combing*. Las fibras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas y aleatorias de fibras de ADN colocadas de menor a mayor distancia entre orígenes activos. En color rojo se observa el pulso de IdU, en verde el de CldU y en azul la fibra de ADN no marcada. **B.** Distribución de las distancias entre orígenes activos, agrupados en intervalos de 20 kb, en función de la frecuencia obtenida para cada intervalo durante las primeras fases de la diferenciación de las células MEL, tomando muestras cada 24 horas. En el análisis estadístico realizado por el test de *Mann Whytney* el P valor siempre es <0,001. **C.** Porcentaje de moléculas de cada intervalo.

Los resultados obtenidos en este apartado demostraron que cuanto más largo es el tiempo de tratamiento con el agente inductor la distancia entre orígenes activos de las células MEL se acorta. Esto sugiere que conforme las células se diferencian se activan nuevos orígenes de replicación. La causa de este efecto podría deberse a un "despertar" de orígenes que en otras condiciones, como puede ser la proliferación incontrolada, no serían necesarios para completar la replicación del genoma y permanecerían silenciados.

4.4.3 Análisis de la replicación bajo condiciones de quiescencia

Los resultados obtenidos respecto a los cambios observados en la velocidad de progresión de las horquillas y en la distancia entre orígenes activos implicaban una asociación directa con la diferenciación terminal de células MEL. Sin embargo, estos resultados podrían interpretarse asimismo como una parada de la replicación *per se* no necesariamente asociada a la diferenciación. Para verificar cuál de las dos posibilidades era la correcta se repitieron los experimentos utilizando células quiescentes. Para ello, se crecieron cultivos de células MEL en ausencia de suero para conseguir células en estado de quiescencia que acaban acumulándose en la fase G0 del ciclo celular (Laquerre, Lagace et al. 1995).

Previo al análisis de los parámetros de la replicación se elaboró una curva de crecimiento para encontrar la concentración óptima de suero fetal bovino (SFB) a la cual las células MEL entran en estado de quiescencia. Se partió de dos concentraciones diferentes de suero fetal bovino, 0% y 2%, utilizando como control células crecidas al 10%. Se tomaron muestras por triplicado cada 24 horas y se contabilizó el número de células de cada muestra con la ayuda de un hemocitómetro. Como se muestra en la Figura 43 la ausencia de suero (0%) es la condición más adecuada para la obtención de cultivos en estado de quiescencia. Durante las primeras 24 horas sin suero, el número de células permanece invariable mientras que en condiciones normales el cultivo se ha duplicado dos veces. Pasadas 24 horas más, las células se han “adaptado” a las condiciones del medio y son capaces de al menos realizar una ronda de replicación. En contraposición, en los cultivos crecidos en presencia de 2% de SFB, se observó que la disminución de la concentración de suero no afecta drásticamente al crecimiento. Aún cuando hay una disminución de la proliferación celular las células son capaces de realizar una ronda de replicación cada 24 horas en presencia de 2% de SFB. Por lo tanto, los experimentos con células quiescentes se llevaron a cabo en medio de cultivo en ausencia completa de suero.



	MEL 10% SFB	MEL 2% SFB	MEL 0% SFB
0 horas	3,00E+05	3,00E+05	2,00E+05
24 horas	1,46E+06	8,00E+05	2,00E+05
48 horas	5,14E+06	2,70E+06	4,80E+05

Figura 43. Curva de crecimiento de las células MEL cultivadas a diferentes concentraciones de suero fetal bovino (SFB). Células MEL en crecimiento asincrónico se cultivaron en ausencia y en presencia de HMBA a diferentes concentraciones de SFB; 10%, 2% y 0% durante 48 horas. La muestra de 10% se utilizó como control. Curva de crecimiento de las tres concentraciones de SFB tomando muestras cada 24 horas del inicio del experimento. Se contaron las células 3 veces en cámara de Neubauer. La tabla inferior muestra el número de células por ml en cada condición.

4.4.3.1 Distribución de las fases del ciclo celular durante el estado de quiescencia de células MEL

Para comprobar la distribución de las fases del ciclo celular en células quiescentes se utilizaron cultivos asincrónicos de células en crecimiento exponencial, no tratadas o tratadas con 5mM HMBA, a las que se suministró un pulso de 20 minutos con BrdU. En la Figura 44 se muestran los perfiles obtenidos para muestras obtenidas de células creciendo en medio normal y células quiescentes. Durante las primeras 24 horas no se observaron cambios significativos entre las células MEL cultivadas en presencia de HMBA y las quiescentes. El porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M fueron similares en ambas muestras, como se muestra en la tabla de la Figura 44B. A las 48 horas se observó que las células quiescentes entran nuevamente en ciclo y adquieren valores similares a los observados en células en crecimiento exponencial. A tiempos equivalentes, comienza la acumulación de las células MEL en la fase G1, como ya se ha demostrado en el apartado 4.1.2.1.

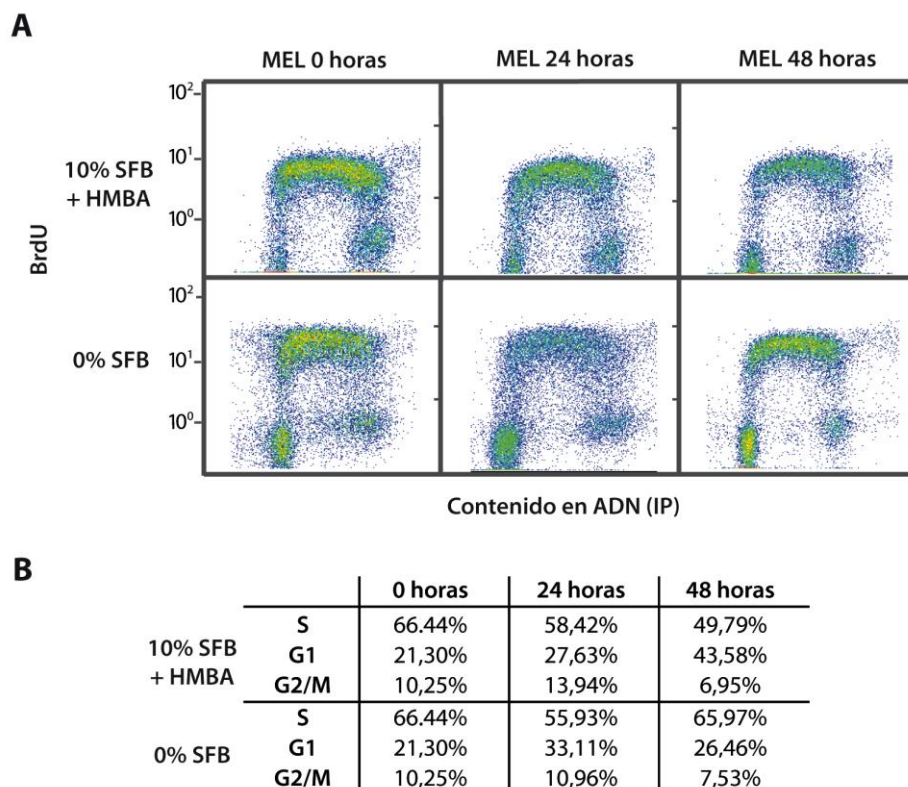


Figura 44. Distribución de células MEL marcadas con BrdU y IP crecidas a diferentes concentraciones de suero fetal bovino. Células MEL en crecimiento asincrónico se cultivaron en presencia de HMBA y 10% de SFB y 0% de SFB durante 48 horas. Se fijaron en etanol, trataron con BrdU y IP y analizaron por citometría de flujo. **A.** Se tomaron muestras cada 24 horas y se representaron en función de su contenido en ADN frente a la incorporación de BrdU durante 20 min. **B.** Porcentaje de células en cada fase del ciclo, G1, S y G2/M.

Estos resultados demostraron que a las 24 horas en ausencia de suero el estado de quiescencia conseguido es óptimo. En consecuencia, no se detectan diferencias en la incorporación de BrdU comparando con la muestra control. Sin embargo, tal como ocurría con células MEL en proliferación y diferenciación, es deseable la aplicación de técnicas que permitan una mayor resolución a nivel de replicación.

4.4.3.2 Análisis de la tasa de progresión de las horquillas en células quiescentes

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la distribución de las distintas fases del ciclo en células quiescentes, se procedió a realizar un análisis de la fase S utilizando la metodología del *ADN combing*. A pesar de la reducida incorporación de BrdU observada en los experimentos descritos en el apartado anterior (Figura 44) ésta fue suficiente para intentar llevar a cabo la cuantificación del

movimiento de las horquillas y la distancia entre orígenes mediante *ADN combing*, después de 24 horas en ausencia de suero. Se utilizó como control en este caso un cultivo de células MEL crecido en presencia de HMBA.

El estudio de la velocidad de avance de las horquillas se realizó a partir de cultivos de células MEL crecidas en ausencia de suero. Se suministró un pulso con IdU durante 20 minutos y seguidamente otro con CldU durante el mismo tiempo. En la figura 45A se muestran ejemplos de fibras de ADN obtenidas según la técnica de *ADN combing*. El análisis de la tasa de progresión de las horquillas se representa en la Figura 45B y en la tabla de la Figura 45C.

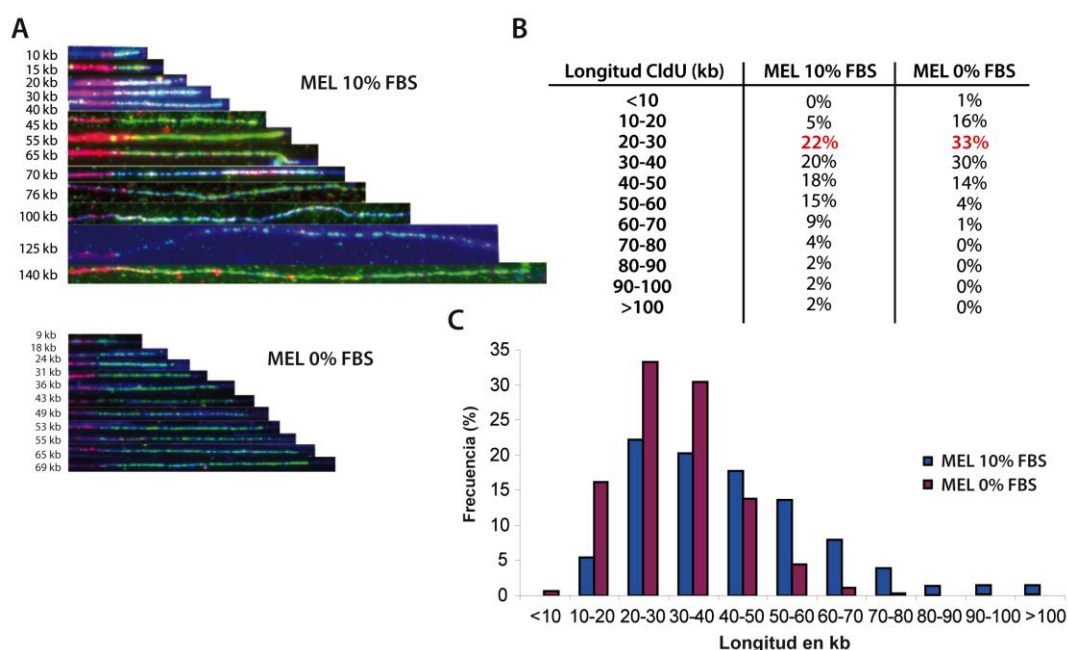


Figura 45. Tasa de replicación de las horquillas durante el estado de quiescencia de las células MEL. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de suero se sometieron a pulsos consecutivos con IdU y CldU durante 20 minutos, respectivamente. Las moléculas de ADN se estiraron según la técnica del *ADN Combing*. Las fibras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas y aleatorias de fibras de ADN colocadas de menor a mayor longitud del segmento marcado por el pulso de CldU. En color rojo se observa el pulso de IdU, en verde el de CldU y en azul la fibra de ADN no marcada. **B.** Distribución de los marcajes de CldU, agrupados en intervalos de 10 kb, en función de la frecuencia obtenida para cada intervalo. En el análisis estadístico realizado por el test de *Mann Whymey* el P valor es < 0,0001. **C.** Porcentaje de moléculas de cada intervalo.

Se observó que aún cuando el intervalo más abundante correspondiente a la longitud del segmento marcado con CldU en ambas muestras es de 20-30 kb, el número

total de fibras aumentó desde el 22 % al 33% en la muestra sin suero. La media de la longitud del fragmento de CldU disminuyó de 54 a 28,9 kb en las células quiescentes y no se detectaron segmentos de CldU de más de 60 Kb. El análisis estadístico de los datos mediante el test de *Mann-Whytney* originó un valor P superior a 0,01, demostrando que no existían diferencias significativas entre las muestras analizadas en lo que se refiere a la velocidad de avance de las horquillas.

Los resultados indicaron por lo tanto que hay una disminución de la velocidad de progresión de las horquillas de replicación, tanto en células en etapas tempranas de la diferenciación como en células quiescentes, siendo más acusada en el caso de las células crecidas en ausencia de suero.

4.4.3.3 Análisis de la distancia entre orígenes activos en células quiescentes

El estudio de la distancia entre orígenes activos se llevó a cabo sobre las mismas preparaciones utilizadas para analizar la progresión de las horquillas de replicación, según se describe en el apartado anterior. En la figura 46A se muestran ejemplos de fibras de ADN con dos orígenes de replicación activos y consecutivos. En las Figuras 46B y C se muestran los datos obtenidos en valores de porcentaje. Se observó un aumento de la distancia entre orígenes activos, del intervalo de 60-80 Kb con el 18% del total de las fibras analizadas (29 fibras de un total de 161) en el caso de células crecidas en 10% de FBS, al intervalo de 100-120 Kb con el 24% del total de las fibras analizadas (13 fibras de un total de 55) en ausencia de suero. Aún cuando la distancia media entre orígenes activos fue similar, 84,9% kb para células crecidas en 10% SFB versus 77,7% para las crecidas en ausencia de suero, fue llamativa la ausencia de moléculas conteniendo orígenes activos separados por largas distancias en las células quiescentes. En el análisis estadístico de los datos mediante el test de *Mann-Whytney*, se obtuvo un valor P inferior a 0,0001, demostrando que los datos eran significativamente diferentes y las muestras analizadas comparables entre sí.

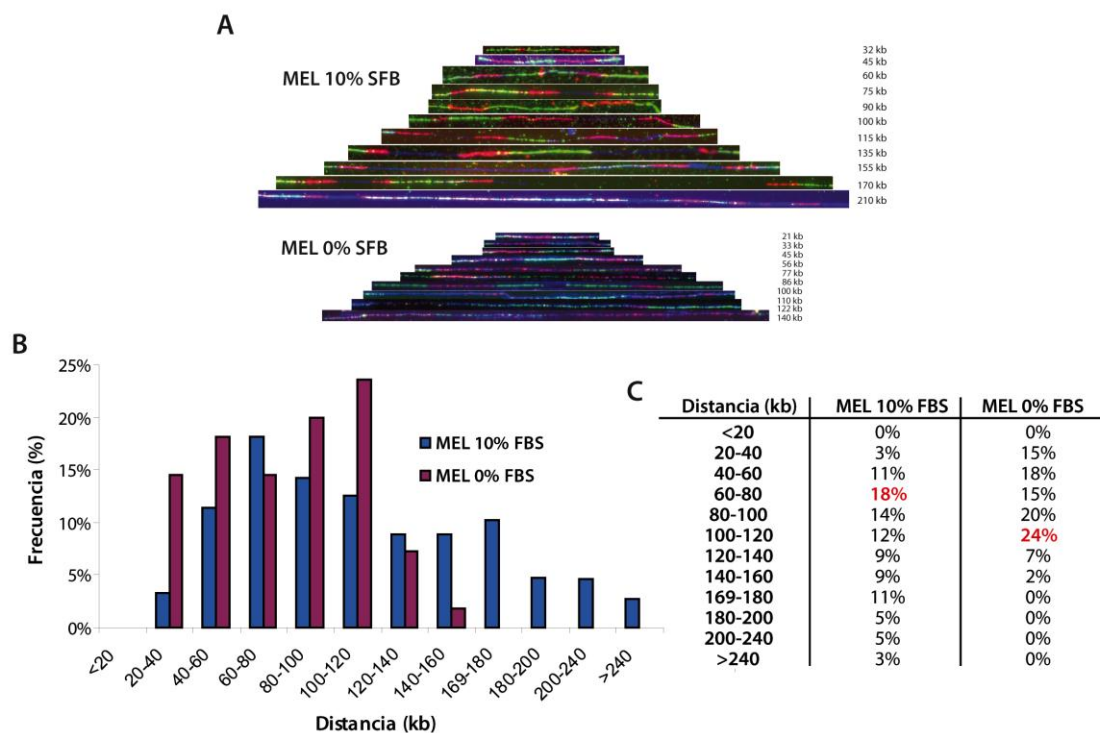


Figura 46. Distancia entre orígenes activos durante el estado de quiescencia de las células MEL. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de suero fueron sometidas a pulsos consecutivos con IdU y CldU durante 20 minutos, respectivamente. Las moléculas de ADN se estiraron según la técnica del *ADN Combing*. Las fibras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas y aleatorias de fibras de ADN colocadas de menor a mayor distancia entre orígenes activos. En color rojo se observa el pulso de IdU, en verde el de CldU y en azul la fibra de ADN no marcada. **B.** Distribución de las distancias entre orígenes activos, agrupados en intervalos de 20 kb, en función de la frecuencia obtenida para cada intervalo. En el análisis estadístico realizado por el test de *Mann-Whitney* el P valor igual a 0,0052. **C.** Porcentaje de moléculas de cada intervalo.

En conjunto, el estudio de la tasa de replicación de las horquillas y la distancia entre orígenes activos, demostraron que en ausencia de suero el número de moléculas con segmentos largos era muy inferior al encontrado en las células crecidas en presencia de suero, indicando la disminución en la velocidad de progresión de las horquillas. Además, el aumento de la distancia entre orígenes activos en células quiescentes sugería que no se activaban orígenes adicionales cuando las células dejaban de proliferar. Esto contrasta con lo descrito durante la diferenciación terminal, en la que se activan nuevos orígenes acompañando a una disminución de la velocidad de avance de la horquillas.

4.4.4 Análisis del *pool* de dNTPs durante la diferenciación de las células MEL

Las células requieren de los cuatro deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) para realizar las funciones de replicación y reparación del ADN. Se ha demostrado que el nivel del *pool* de dNTPs varía a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (Reichard 1988) y esta variación es capaz de modular la selección del sitio de iniciación de la replicación (Anglana, Apiou et al. 2003). Por otra parte, la concentración efectiva de los dNTPs en sitios de replicación del ADN *in vivo* es más alta que la media de la concentración de dNTPs en el volumen celular total. Teniendo en cuenta esta afirmación se intentó comprobar si los cambios observados en la replicación durante la diferenciación estaban asociados a variaciones en los niveles del *pool* de dNTPs

La ribonucleotido reductasa (RNR) cataliza la reacción en la que los 2'-deoxiribonucleótidos (dADP, dGDP, dUDP y dCDP) son sintetizados desde los correspondientes ribonucleósidos 5'-difosfatos (ADP, GDP, UDP y CDP). La RNR está formada por dos subunidades: R1, subunidad de mayor tamaño de 160 kDa y que tiene al menos dos sitios reguladores diferentes y R2, de menor tamaño, 78 kDa, y que contiene una molécula de hierro que participa en la catálisis del residuo de tirosina. La expresión de ambas proteínas es necesaria para la actividad de la RNR. Las subunidades R1 y R2 están codificadas por genes distintos localizados en diferentes cromosomas y los mARNs se expresan de manera desigual durante el ciclo celular (Engstrom, Eriksson et al. 1985; Tonin, Stallings et al. 1987). El nivel de la proteína R1 permanece estable durante todo el ciclo celular, mientras que el de la R2 sólo se expresa al final de G1 y al comienzo del S, coincidiendo con la replicación.

Con el objeto de detectar si los cambios observados en la replicación durante la diferenciación estaban asociados a variaciones en los niveles del *pool* de dNTPs se realizó un estudio del *pool* de dNTPs mediante la determinación del nivel de transcripción de la subunidad R1 de la RNR. Se decidió analizar esta subunidad debido a que se partía de un cultivo asincrónico de células y su expresión es estable durante todo el ciclo celular. Se utilizaron tres cultivos independientes de células en crecimiento exponencial tratados con HMBA y se recogieron muestras a las 24 horas y 48 horas. Como control se utilizaron cultivos crecidos en presencia de hidroxiaurea (HU) 2mM

durante 2 y 18 horas de tratamiento. La HU inhibe directamente a la RNR y como consecuencia la expresión disminuye después del tratamiento. Para determinar la expresión de la R1 se llevó a cabo una PCR a tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos en presencia de *SybrGreen*.

En la figura 47A se muestran los datos obtenidos utilizando como control la muestra crecida en presencia de HU durante 2 horas. Los experimentos demostraron que el nivel de expresión de la subunidad R1 de la RNR durante la proliferación (0 horas) y la diferenciación (24 y 48 horas) aumenta aproximadamente dos veces, de forma similar a la del control. Se observó también que el nivel de expresión de la R1 no varía conforme las células avanzan en el proceso. Cuando se utilizó como control un cultivo tratado con HU durante 18 horas (Figura 47B) se comprobó que la variación de expresión de la subunidad R1 es menor. Se sabe que el daño continuado producido por la HU eleva los niveles de actividad de la RNR al mismo tiempo que su expresión, consecuencia de la activación de puntos de reparación en el ADN (Reichard 1988). Este aumento de la expresión se mantuvo prácticamente igual, en torno a 1,5 veces, durante las primeras fases de la diferenciación terminal de las células MEL.

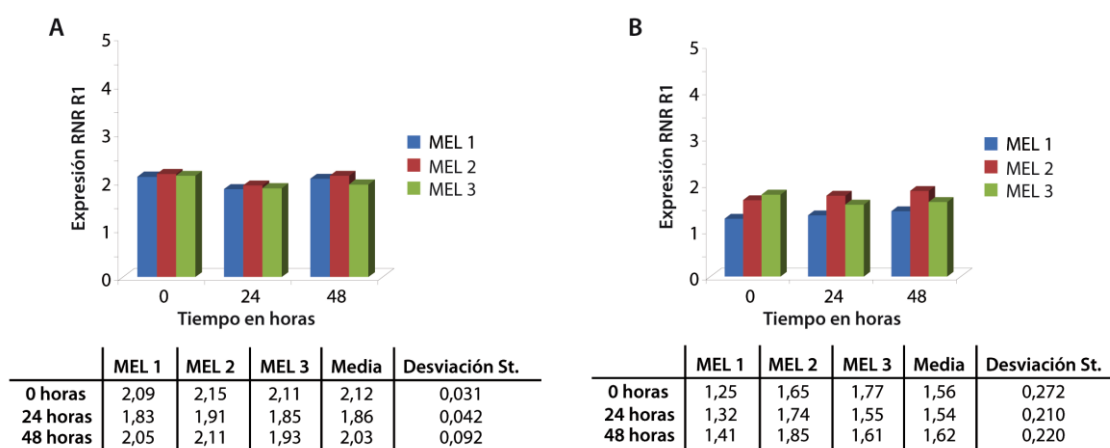


Figura 47. Análisis del pool de dNTPs durante las primeras etapas de la diferenciación de las células MEL. Tres cultivos independientes de células MEL se crecieron en presencia y ausencia de HMBA 5mM durante 48 horas. Se tomaron muestras cada 24 horas. Como control se crecieron células MEL en presencia de HU 2mM durante 2 y 18 horas. Se extrajo el cADN de todas las muestras (ver materiales y métodos) y se analizó por PCR a tiempo real. **A.** Incremento en número de veces de cada muestra respecto a su control de HU de 2 horas. La tabla inferior muestra los datos de cada set de muestras, las medias y las desviaciones estándar en cada caso. Los datos se analizaron bajo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. **B.** Incremento en número de veces de cada muestra respecto a su control de HU de 18 horas. La tabla inferior muestra los datos exactos de cada set de muestras, las medias y las desviaciones estándar en cada caso. Los datos se analizaron bajo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Estos resultados permiten concluir que la utilización de nuevos orígenes de replicación y la disminución de la progresión de las horquillas durante la diferenciación terminal no están relacionadas con variaciones en el *pool* de dNTPs.

4.4.5 Análisis del daño a ADN producido por el tratamiento con HMBA

En eucariotas el ADN se enrolla alrededor de un grupo de histonas, entre ellas la H2A, para formar los nucleosomas. La histona H2AX es una variante de la familia de histonas H2A. Estructuralmente es similar a otras especies de histonas H2A excepto por la presencia de una única cola COOH terminal que contiene cuatro residuos de serina. La H2AX es capaz de fosforilarse en la serina 139 convirtiéndose en la gamma-H2AX (γ H2AX) como reacción a las roturas de ADN de doble cadena (Rogakou, Pilch et al. 1998). Debido a esta característica, se ha utilizado como biomarcador sensible a daño de ADN.

Para comprobar que la concentración de HMBA utilizada para desbloquear células MEL y conseguir su diferenciación terminal, no induce daño a ADN produciendo como consecuencia modificaciones en la replicación, se analizó la expresión de γ H2AX en células MEL tratadas con 5mM del agente inductor. Se realizó un estudio inmucitoquímico de células crecidas en ausencia o presencia de HMBA hasta las 48 horas. En la Figura 48 se pueden observar los núcleos en color azul debido a su detección con DAPI y la señal correspondiente al anticuerpo anti-phospo-Histone H2AX Ser 139, en color verde. Como control positivo se utilizaron células cultivadas en presencia de HU 2mM que produce roturas de doble cadena en el ADN, a tiempos de 24 y 48 horas.

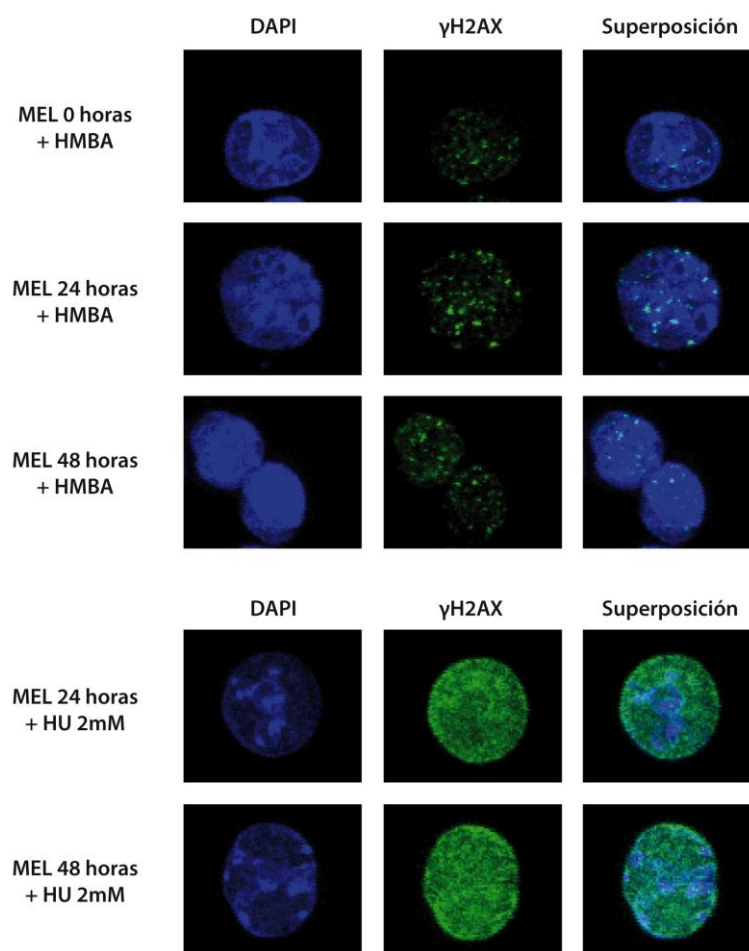


Figura 48. Estudio del daño al ADN producido durante la diferenciación de las células MEL mediante la visualización de γ H2AX. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de HMBA 5mM durante 24 y 48 horas. Como control positivo se utilizó un cultivo de MEL crecido en presencia de HU 2mM durante 24 y 48 horas. Las células se tiñeron con DAPI, núcleos en color azul y posteriormente se añadió el anticuerpo anti-phospho-Histone H2AX Ser 139 seguido del anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488, en color. Los paneles de la derecha corresponden a la superposición de ambas tinciones.

Según se observa en la Figura 48 aún cuando la γ H2AX se detecta en células indiferenciadas (MEL 0 horas), la señal aparece localizada en focos específicos en cultivos tratados con HMBA y se mantiene constante durante la diferenciación (24 y 48 horas). Esta disposición fue descrita previamente en células tumorales (Bonner, Redon et al. 2008). En contraposición, en el caso de las muestras crecidas en presencia de HU, (Figura 48, paneles inferiores), la señal aparece de forma difusa, abarcando todo el núcleo. Esta disposición es debida al gran número de dobles roturas producidas por el tratamiento con HU.

Estas observaciones han permitido confirmar que el tratamiento con HMBA no induce nuevas roturas en el ADN que puedan afectar a la replicación durante la diferenciación terminal de las células MEL.

4.4.6 Análisis del estado de la cromatina durante la diferenciación de las células MEL

Los cromosomas eucariotas manifiestan dos tipos de cromatina: la forma transcripcionalmente activa, no condensada, conocida como eucromatina, y la forma no activa, muy condensada, descrita como heterocromatina. Una característica de la heterocromatina es su tardía replicación durante la fase S del ciclo celular, siendo la última porción del genoma en ser replicada (Lima-de-Faria and Jaworska 1968). El mecanismo implicado en su replicación es desconocido, aunque su estructura condensada y su capacidad para silenciar la transcripción sugieren que podría reprimir su propia replicación. Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la tasa de replicación de las horquillas es diferente entre zonas de eucromatina y heterocromatina (Takebayashi, Sugimura et al. 2005).

La HP1 es una proteína que se localiza en las zonas pericentroméricas y teloméricas de los cromosomas (Kwon and Workman 2008) y está asociada a la heterocromatina encargada de la regulación del remodelamiento, silenciamiento y transcripción de la cromatina (Eissenberg and Elgin 2000). En los genomas humanos y de ratón se han identificado tres subtipos de proteína HP1 (α , β y γ) (Singh, Miller et al. 1991; Saunders, Chue et al. 1993). Se ha observado que estos subtipos difieren significativamente en su localización nuclear, distribución mitótica y fosforilación en relación con el ciclo celular (Minc, Allory et al. 1999; Bartova, Pachernik et al. 2007). HP1 α se encuentra mayoritariamente en los centrómeros, mientras que HP1 β y HP1 γ se pueden encontrar en los centrómeros y pericentrómeros, así como en sitios eucromáticos de los brazos de los cromosomas (Minc, Allory et al. 1999).

Con el fin de determinar si la diferenciación terminal de las células MEL va acompañada de la heterocromatinización del ADN se llevaron a cabo estudios

inmunocitoquímicos y mediante citometría de flujo, para evaluar los niveles de la proteína HP1 α en las fases iniciales de la diferenciación terminal. Se decidió analizar la subunidad α debido a su estabilidad y reproducibilidad en diferentes tipos celulares (Wreggett, Hill et al. 1994; Minc, Allory et al. 1999; Saffery, Earle et al. 1999).

El estudio inmunocitoquímico se realizó a partir de células en crecimiento asincrónico en presencia de HMBA tomando muestras a los tiempos 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el inductor. En la Figura 49 se muestran preparaciones de células MEL en donde se observan los núcleos en color azul teñidos con DAPI y la señal correspondiente al anticuerpo anti-HP1 α en color verde. La señal de la proteína HP1 α se visualiza localizada en focos fluorescentes, incrementándose su intensidad y cantidad desde el estado proliferativo (0 horas) hasta las 48 horas, de manera constante. El análisis cuantitativo mediante citometría de flujo (Figura 49B), confirmó los resultados del estudio inmunocitoquímico observándose una variación de los picos correspondientes a la proteína HP1 α equivalente a un factor de 1.4 veces cada 24 horas, en células cultivadas en presencia de HMBA.

Estos resultados demuestran que existe una heterocromatinización progresiva y constante del ADN cuando las células MEL en proliferación se liberan del bloqueo con HMBA y son reprogramadas hacia su diferenciación terminal.

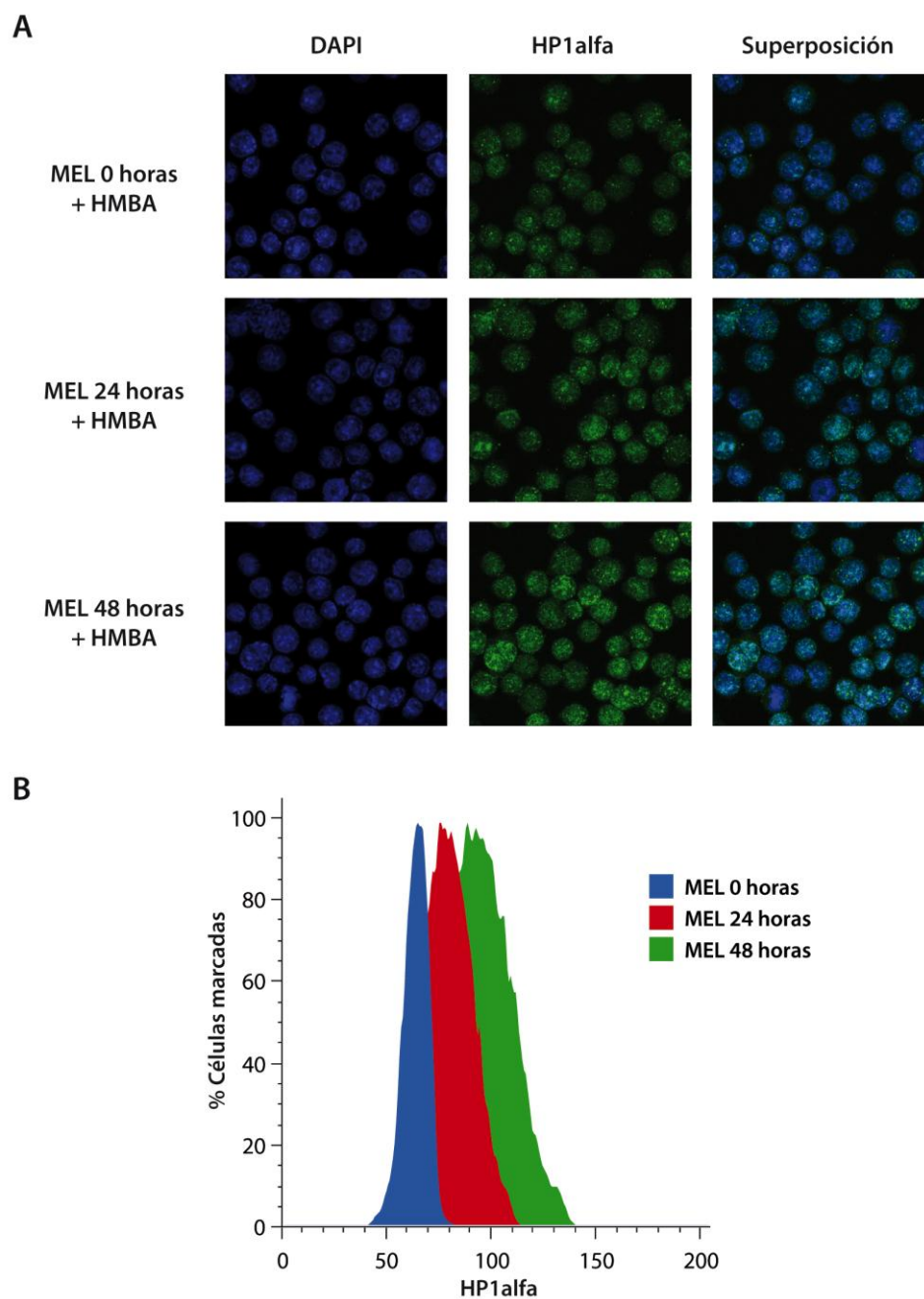


Figura 49. Estudio del estado de la cromatina durante las primeras fases de la diferenciación de las células MEL. Células MEL en crecimiento asincrónico, cultivadas en presencia y ausencia de HMBA 5mM durante 48 horas. **A.** Inmunolocalización de HP1 α . Las células se tiñeron con DAPI, en color azul y posteriormente se añadió el anticuerpo anti-HP1 α seguido del anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488, en color verde. **B.** Gráfico compuesto por las señales de HP1 α obtenidas en el estudio de citometría de flujo. El gráfico se representa de forma lineal y muestra el porcentaje de células con diferentes niveles de HP1 α en cada caso.

5 Discusión

5.1 La interacción entre superenrollamiento y desencadenamiento durante la replicación

La ADN girasa es la única topoisomerasa conocida capaz de introducir superenrollamiento negativo en los dúplex de ADN. Los eucariotas carecen de una topoisomerasa como la ADN girasa y su única fuente de superenrollamiento negativo proviene del enrollamiento del ADN alrededor de los nucleosomas.

En cualquier caso, el superenrollamiento es una propiedad exclusiva de dominios topológicamente cerrados. La presencia de un extremo libre en una de las dos hebras del dúplex de ADN permite que la tensión responsable del superenrollamiento se disipe. Estas moléculas se encuentran relajadas y su LK es igual a 0.

En la presente tesis se estudió el minicromosoma circular pRS316 durante la formación de encadenados *in vivo* en *S. cerevisiae*. Para ello se utilizó la estirpe top2-td inducible con una mutación tipo degrón en la Top2, lo que permitió la visualización de encadenados acumulados al final de la replicación. Los resultados obtenidos, analizados mediante geles bidimensionales (Figura 15), indicaron que en eucariotas el enrollamiento del ADN alrededor de los nucleosomas ocurre inmediatamente después del paso de la horquilla de replicación, pero no tiene significancia topológica ya que las hebras nacientes tienen los extremos libres, disipando de esta forma toda tensión torsional. El enrollamiento alrededor de los nucleosomas adquiere instantáneamente significado topológico una vez que las hebras nacientes son ligadas y cada dúplex se convierte en un dominio topológico cerrado. En procariotas, por el contrario, la ADN girasa introduce progresivamente superenrollamiento negativo una vez que ha concluido la replicación, y éste ya no se pierde al tratarse de dominios topológicamente cerrados. En otras palabras, mientras que en procariotas la adquisición de superenrollamiento negativo ocurre progresivamente conforme los dúplexes hermanos se desencadenan, en eucariotas la adquisición de tensión torsional ocurre de forma repentina justo después de que las hebras nacientes se ligan visualizándose entonces los encadenados.

5.2 El complejo condensina, un elemento clave para la segregación cromosómica

5.2.1 Las condensinas reconfiguran la topología de los cromosomas mitóticos

Incluso si las condensinas no interactuasen directamente o no fueran capaces de reclutar topoisomerasas, podrían promover el desencadenamiento de las cromátidas hermanas desplazando la reacción de equilibrio de la Top2 hacia el desencadenamiento a través de una acción que altera las propiedades de las cromátidas hermanas.

En 1997 Hirano y colaboradores estudiaron la condensina 13S en extractos de huevos de *Xenopus* y comprobaron que un complejo de proteínas de 5 subunidades tiene un papel fundamental en la condensación cromosómica. Demostraron que este complejo es capaz de introducir superenrollamiento positivo en ADN de naturaleza circular en presencia de la topoisomerasa I. El superenrollamiento positivo estaba topológicamente ligado a la unión de la condensina al ADN y podría ser consecuencia del enrollamiento del ADN alrededor del complejo condensina (Kimura and Hirano 1997). En *S. cerevisiae* se sabe que las condensinas son responsables de la compactación axial de la cromatina pericéntrica y actúan como partes de un “resorte” molecular que genera tensión entre las cromátidas hermanas (Stephens, Haase et al. 2011).

Partiendo de estas premisas, en la presente tesis se realizó un estudio de la movilidad electroforética de los encadenados del minicromosoma pRS316 en diferentes estirpes de *S. cerevisiae* en las que la Top2 estaba degradada. El análisis se llevó a cabo mediante geles bidimensionales en presencia y ausencia de cloroquina. Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que los encadenados (Cat C) poseían inicialmente superenrollamiento negativo y conforme avanzaba el tiempo hacia anafase sufrían una transformación para albergar finalmente superenrollamiento positivo (Cat C*), siendo necesaria la presencia del huso mitótico y la condensina Smc2 para que esta transformación tuviese lugar. El estudio de la movilidad electroforética de los monómeros en las mismas condiciones confirmó los resultados expuestos

anteriormente, apreciándose una distribución más positiva del superenrollamiento de las especies monoméricas.

Como ya se ha mencionado en la introducción, en procariotas la topo IV es la enzima encargada del desencadenamiento del ADN *in vivo* y su función depende del superenrollamiento del ADN, siendo el papel de la ADN girasa el de introducir superenrollamiento (-) en el ADN transformándolo así en un sustrato más accesible. (Zechiedrich, Khodursky et al. 1997; Hardy, Crisona et al. 2004; Martinez-Robles, Witz et al. 2009). El superenrollamiento introducido por la ADN girasa no está topológicamente limitado, por lo que cierto desenrollamiento podría ocurrir durante la replicación del ADN, la reparación y la transcripción. Estas regiones relajadas no son buenos sustratos para la Topo IV durante el desencadenamiento de las cromátidas hermanas por lo que se supone que deben ser replegadas, en forma de superenrollamiento negativo para su correcta segregación. Además, se cree que proteínas del complejo SMC bacteriano podrían participar activamente en este proceso de replegamiento (Hirano 2000).

En células eucariotas, la ausencia de la ADN girasa para introducir superenrollamiento negativo se reemplaza por el enrollamiento levógiro de la doble hélice sobre los nucleosomas. Plegamientos de orden superior requieren de una estrategia más sofisticada que involucren formaciones solenoidales de ADN de doble cadena con superenrollamiento positivo dirigido por el complejo condensina (Kimura and Hirano 1997; Kimura, Rybenkov et al. 1999). Por analogía a la segregación cromosómica bacteriana, se cree que el proceso de plegamiento mediado por condensinas posiblemente favorece el desencadenamiento de las cromátidas hermanas, que está mediado por la Top2 en células eucariotas. La resolución local de las cromátidas hermanas, facilita más la unión de condensina, lo que permite seguir propagando la condensación. En este escenario, las proteínas bacterianas del complejo SMC y complejo condensina eucariota podrían desempeñar funciones análogas en la separación de las cromátidas hermanas: organizan activamente el plegado intramolecular del ADN, con lo que la estructura de las cromátidas hermanas se hace más accesible y sensible a las enzimas encargadas del desencadenamiento. En el ciclo celular eucariota, el desencadenamiento no se completa en metafase, ya que queda un

bajo nivel de encadenamiento a lo largo de las cromátidas que finalmente se eliminan durante anafase (Hirano 2000).

En la presente tesis se demuestra que durante la mitosis la formación del huso mitótico y la presencia de la condensina Smc2 inducen superenrollamiento positivo que, en condiciones normales, la Top2 *in vivo* relajaría con gran eficiencia. Pero la degradación de la Top2, en la estirpe que hemos utilizado, nos ha permitido acumular encadenados, reducir la relajación del superenrollamiento y visualizarlo. Teniendo en cuenta estos resultados y extrapolando los modelos expuestos anteriormente por Hirano y Hardy, se plantea un modelo de cómo se lleva a cabo el desencadenamiento completo del genoma por la Top2 durante la mitosis. Aunque la Top2 puede eliminar activamente el encadenamiento entre cromátidas hermanas después de la replicación, encadenados residuales siguen presentes durante la mitosis, por lo que se requiere la presencia de Top2 en esta fase del ciclo celular (Holm, 1985 #443; Uemura, 1987 #507; (Baxter, 2008 #450). Proponemos que el superenrollamiento positivo inducido por el huso mitótico y la condensina Smc2 genera una conformación de los cromosomas encadenados en la que los cruces intermoleculares son separados de los cruces intramoleculares con una geometría tal que maximiza la actividad desencadenadora de la Top2. Una vez que las cromátidas hermanas están completamente resueltas, la Top2 rápidamente relajaría el superenrollamiento positivo generado, modificando la topología intracromosómica a un estado comparable al observado antes de la transición, permitiendo de este modo que todo el encadenamiento sea eliminado.

5.2.2 Las condensinas promueven el desencadenamiento de las cromátidas hermanas

Una de las razones por la que la ausencia de condensinas no permitiría la resolución de las cromátidas hermanas sería la persistencia de encadenados del ADN más allá del comienzo de anafase. Estos encadenados son eficientemente eliminados por las topoisomerasas de tipo II. Por lo tanto, una de las funciones de las condensinas sería dirigir la actividad de las topoisomerasas para el desencadenamiento del ADN durante la segregación cromosómica.

Existen evidencias de la interacción entre topoisomerasas y el complejo de proteínas SMC. Dos estudios recientes en *E. coli* demuestran que la proteína MukB del complejo SMC se une directamente y estimula la actividad de la Topo IV (Hayama and Mariani 2010; Li, Stewart et al. 2010). La adición de un exceso de MukB a la Topo IV promueve la relajación del superenrollamiento y en menor medida el desencadenamiento de las moléculas de ADN encadenadas *in vitro*. Mutaciones en el dominio de MukB o en la Topo IV previenen esta asociación anulando el efecto estimulador propuesto. Una simple explicación de estas observaciones sugiere que la interacción de MukB con la Topo IV hace que ésta sea más activa. Alternativamente, MukB podría reconocer zonas del ADN encadenadas y ayudar a movilizar a las topoisomerasas para resolverlas (Cuylen and Haering 2011).

¿Existe una interacción similar entre condensinas y topoisomerasas en células eucariotas? Tal interacción fue sugerida por el descubrimiento de mutaciones en genes de la levadura de fisión que codificaban para la condensina Smc4 y la Top2 los cuales eran letales (Saka, Sutani et al. 1994), existiendo poca evidencia de una interacción directa entre las dos proteínas (Hirano and Mitchison 1994; Bhat, Philp et al. 1996). Además, la certeza de que las condensinas podrían estimular la actividad de la Top2 es limitada. No obstante, extractos de células de *Drosophila* en los que Smc4 fué eliminada no son capaces de desencadenar círculos de ADN (Coelho, Queiroz-Machado et al. 2003). Por el contrario, en extractos mitóticos de rana sin condensinas muestran que no existe reducción en la actividad de desencadenamiento (Cuvier and Hirano 2003).

Aunque parece que las condensinas no promueven la actividad enzimática de la Top2 directamente, podrían ser importantes para la movilización de topoisomerasas hacia el desencadenamiento de las cromátidas hermanas. El descubrimiento de que las condensinas o dímeros Smc2/Smc4 promueven el anudamiento de plásmidos y preferencialmente unen substratos a la estructura del ADN *in vitro* (Kimura and Hirano 1997; Sakai, Hizume et al. 2003) respalda la hipótesis de que podrían tener afinidad por zonas del ADN con entrecruzamientos.

5.3 Desplazamiento asimétrico de las horquillas de replicación

En la gran mayoría de los replicones eucariotas, la activación de un origen de replicación supone el ensamblaje de dos complejos replicativos completos que se mueven en direcciones opuestas (Kornberg and Baker, 1992). La progresión asimétrica de las horquillas de replicación ya ha sido observada anteriormente. En plásmidos OriC de *E. coli*, las dos horquillas de replicación divergentes no progresan a la misma velocidad y, en algunos casos extremos, la replicación de estos plásmidos puede ocurrir de modo unidireccional (Kaguni and Kornberg 1984; Yoshimoto, Kambe-Honjoh et al. 1986; Yoshimoto, Nagai et al. 1986). Geles bidimensionales revelaron la progresión asimétrica de las horquillas en etapas muy tempranas en el cromosoma de *Mycoplasma capricolum* (Miyata and Fukumura 1997). Este fenómeno no está restringido sólo a procariotas. Esta misma observación se ha realizado en células eucariotas. En células de mamíferos infectadas con SV40, se observó mediante microscopía electrónica y geles bidimensionales que las horquillas de replicación podían encontrarse en diferentes sitios y no necesariamente localizados a 180° del origen de replicación (Tapper and DePamphilis 1980; Levac and Moss 1996). Tack y colaboradores realizaron una caracterización detallada de la asimetría de la progresión de las horquillas durante la replicación temprana y tardía en SV40 {Tack, 1987 #805}. Concluyeron que aunque existían diferencias en la tasa de la progresión de las horquillas, en el caso de los orígenes tempranos esta asimetría parecía estar relacionada con una salida asincrónica de las horquillas de replicación desde el mismo origen. Una observación parecida se hizo en el virus del poliooma {Buckler-White, 1982 #807}. La misma apreciación se realizó en plásmidos replicando en *S. pombe* (Caddle and Calos 1994). Finalmente estudios *in vitro* en *S. cerevisiae* demostraron que plásmidos que iniciaban la replicación específicamente en el ARS1 con una progresión bidireccional. Sin embargo, dicha progresión no era sincrónica y se detectaron moléculas asimétricas desde el comienzo de la replicación, sugiriendo que las dos horquillas raramente disparaban al mismo tiempo (Celniker, Sweder et al. 1984). Estas observaciones fueron confirmadas en nuestro laboratorio por Santamaría y colaboradores que detectaron una heterogeneidad en la población de IsR en plásmidos de replicación autónoma *in vivo* en *S. cerevisiae*.

Propusieron que esta terminación de la replicación de forma aleatoria era debida a la salida asincrónica de las dos horquillas desde un origen bidireccional junto con diferencias en la tasa de progresión de las mismas (Santamaria, Viguera et al. 2000). Estas observaciones podrían extenderse a todos los orígenes bidireccionales.

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la replicación de cromosomas artificiales en *S. cerevisiae in vivo*, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Los resultados obtenidos indican que la replicación de los minicromosomas circulares se inicia siempre en el ARS. La progresión asimétrica de las dos horquillas es un fenómeno habitual en levaduras, de forma que el encuentro de ambas, que define la terminación de la replicación, no se produce casi nunca en una posición fija diametralmente opuesta al ARS, sino que puede tener lugar a lo largo de una amplia región del cromosoma que se denomina región de terminación y que se identifica en geles bidimensionales como una zona triangular localizada entre el arco de recombinantes, la caída de la Y simple y el arco de Y doble, tal como se observa en la Figura 26. En el corte con la enzima BamHI (Figura 25A), aunque el ARS está localizado prácticamente en la zona central del fragmento de estudio el tamaño de la burbuja no corresponde al esperado para esta localización. El arco de burbujas se convierte en un arco de Y simples antes de lo que cabría esperar, indicando que una de las horquillas llega al extremo del fragmento mucho antes que la otra. El mismo efecto se observa en el corte PvuI (Figura 25B), lo que confirma la salida y progresión asimétrica de las horquillas de replicación desde un mismo origen bidireccional.

5.3.1 Estructura del centrómero

El centrómero es una estructura característica definitoria de los cromosomas eucariotas, necesario para la fijación de los microtúbulos del huso y la segregación a los polos en mitosis y meiosis. La unidad fundamental del centrómero de las levaduras es un nucleosoma específico, en el que la histona 3 centromérica (cenH3) que reemplaza a la H3 canónica (Malik and Henikoff 2009).

Rigurosas determinaciones de la conformación de los nucleosomas cenH3 fueron posibles mediante la utilización de la levadura de gemación, en la que los

centrómeros están definidos por una secuencia de alrededor de 120 pb. Cuando se introducen en un minicromosoma, esta secuencia media la segregación a los polos de forma precisa. Minicromosomas de levaduras se utilizaron también para el análisis de su topología *in vivo* y estos estudios demostraron que los nucleosomas cenH3 inducen superenrollamiento positivo, de signo contrario al que inducen los nucleosomas canónicos (Furuyama and Henikoff 2009). El superenrollamiento positivo inducido por la presencia del nucleosoma cenH3 fue suficiente para concluir que el ADN se enrolla alrededor del nucleosoma de manera *dextrógira* (Huang, Chang et al. 2011).

En los distintos patrones obtenidos en el estudio de la replicación del cromosoma circular pYAC_MEM de la presente tesis doctoral (Figuras 25 y 26), se observó un bloqueo de la horquilla de replicación a la altura del centrómero. Este bloqueo podía ser temporal o permanente según los casos. Este bloqueo de la horquilla podría relacionarse con la presencia de superenrollamiento positivo provocado por el nucleosoma que lo compone. Como ya se ha descrito con anterioridad todo superenrollamiento positivo no compensado por delante de la horquilla de replicación colapsa el avance de la misma. En contraposición, en el cromosoma lineal (Figura 28B) no se produce el colapso de la horquilla lo que podría explicarse dado que al disiparse todo el superenrollamiento por los telómeros el consiguiente bloqueo en CEN no tiene lugar.

La presencia de un único nucleosoma inductor de superenrollamiento positivo no parece ser lo suficientemente relevante para detener una horquilla de forma permanente, pero si unimos además toda la maquinaria proteica que tiene que desplazar la horquilla para avanzar, el pequeño tamaño del minicromosoma circular (8 kb) y que una horquilla en sentido contrario se desplaza en dirección contraria alcanzando el centrómero antes de que la horquilla detenida pueda reanudar su movimiento, la presencia del nucleosoma cenH3 cobra sentido.

5.3.2 Implicaciones de la colisión entre replicación y transcripción

La replicación y la transcripción son dos procesos fundamentales que pueden ocurrir simultáneamente en la misma molécula de ADN, dando lugar a una eventual colisión de ambas maquinarias. El resultado del encuentro de ambas maquinarias depende inicialmente de la orientación de la unidad de transcripción con respecto a la horquilla de replicación. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que colisiones cabeza con cabeza son más problemáticas que las colisiones codireccionales, afectando más drásticamente al movimiento de las horquillas tanto en bacterias como en eucariotas unicelulares (Deshpande and Newlon 1996; Mirkin and Mirkin 2005; Prado and Aguilera 2005; Wang, Berkmen et al. 2007; Srivatsan, Tehranchi et al. 2010). Experimentos *in vitro* con el sistema de replicación T4 demostraron que en el caso de una colisión coorientada, el complejo ternario de la ARN polimerasa detiene momentáneamente la progresión de las horquillas de replicación. Como resultado de esta interacción la maquinaria transcripcional no sólo es desplazada del molde por el replisoma sino que, una vez superada, es perfectamente competente para continuar la elongación del mensajero {Liu, 1993 #925; Liu, 1994 #932}. Otro problema añadido es que tanto la transcripción como la replicación generan superenrollamiento positivo por delante de las horquillas, lo que podría dar lugar a un bloqueo de tipo topológico más que físico para el continuo movimiento de las horquillas (Wu, Shyy et al. 1988; Olavarrieta, Hernandez et al. 2002).

En los patrones de replicación obtenidos en los geles bidimensionales para el caso del minicromosoma circular (Figuras 25 y 26) se observó una ralentización de la velocidad de avance de la horquilla que recorre el cromosoma en la zona del gen de histidina, que se encuentra coorientado con la horquilla de replicación. Esta disminución de la velocidad podría deberse a la colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción. De lo que se podría deducir que el replisoma necesita más tiempo para resolver esta eventualidad y por ello la velocidad de avance se ve afectada de forma evidente. En el estudio de la replicación del minicromosoma lineal no se observó esta eventualidad.

5.4 Iniciación de la replicación en secuencias teloméricas

Los telómeros son estructuras desafiantes para la replicación, debido a las secuencias repetitivas y las complicadas estructuras que pueden adoptar. En células humanas y de levaduras, existen evidencias de que las horquillas de replicación se detienen al llegar al ADN telomérico (Makovets, Herskowitz et al. 2004; Miller, Rog et al. 2006), indicando que estas zonas replican de manera distinta y más lenta. En *S. cerevisiae*, la replicación se inicia en los ARS, los cuales están ligados al complejo de reconocimiento de los orígenes (ORC) de manera específica (Bell and Stillman 1992). Los orígenes que replican el ADN telomérico se localizan normalmente en la región subtelomérica y nunca se disparan dentro de las secuencias teloméricas (Gilbert 2004; Gilson and Geli 2007). Hallazgos recientes de estudios con células de mamíferos indican que proteínas de los pre-RCs pueden localizarse en los telómeros a través de interacciones con TRF2 (Deng, Dheekollu et al. 2007; Tatsumi, Ezura et al. 2008). Si estos pre-RCs representan orígenes funcionales es desconocido.

El inicio de la replicación en los telómeros ha sido observado en fibroblastos de embriones de ratón mediante el análisis de moléculas individuales. La fracción de telómeros que mostró orígenes activos fue pequeña, alrededor del 3%, sugiriendo que en los fibroblastos de embrión de ratón la mayoría de las horquillas de replicación viajan desde los orígenes subteloméricos hacia el ADN telomérico (Sfeir, Kosiyatrakul et al. 2009).

Kurth y colaboradores establecieron un modelo donde substratos lineales de ADN compuestos exclusivamente por repeticiones teloméricas podrían ser capaces de iniciar la replicación en extractos de *Xenopus*, sugiriendo que orígenes activos podrían ensamblarse y disparar en estas zonas de los cromosomas. Además, se observó que la replicación era menos eficiente en telómeros con pocas repeticiones teloméricas (Kurth and Gautier 2010).

El estudio de la replicación del minicromosoma lineal YAC_MEM en *S. cerevisiae* evidenció un patrón doble de replicación (Figura 28B). El patrón de burbuja prácticamente completa indica la iniciación de la replicación en el ARS4. Por otro lado,

el patrón de Y simple completa, indica la iniciación de la replicación en uno de los extremos del cromosoma, zona en la que se localizan las repeticiones teloméricas, por lo que en estos casos existiría una replicación unidireccional del minicromosoma. Esta nueva observación confirma que en eucariotas como *Xenopus*, *S. cerevisiae* y posiblemente en otros organismos la iniciación de la replicación podría ocurrir en el ADN telomérico.

El análisis de intermediarios de replicación por electroforesis bidimensional en geles de agarosa ha permitido demostrar que la iniciación de la replicación coincide con la localización de ARSs tanto en minicromosomas circulares extra-cromosómicos (Brewer and Fangman 1987; Huberman, Spotila et al. 1987) como en el ADN genómico (Newlon and Theis 1993).

5.5 Posibles artefactos que afectan a los patrones de replicación de cromosomas artificiales.

Durante el estudio de la replicación del minicromosoma circular se obtuvieron tres patrones diferentes de progresión de las horquillas de replicación. Una posible interpretación de estos patrones podría deberse a la integración del minicromosoma circular en el genoma de la levadura. En dicho caso los patrones de replicación observados no corresponderían al menos en un 100% a la replicación extracromosómica propuesta, sino que existiría una contaminación de los patrones observados debidos a la integración del cromosoma en el genoma de la levadura.

En 1979 Stinchcomb y colaboradores, identificaron los ARSs, fragmentos de ADN capaces de iniciar la replicación de minicromosomas circulares sin necesidad de integrarse en el genoma de la levadura. En estos casos la iniciación de la replicación estaba asociado además a una alta tasa de transformación (2000-4000 colonias por μ g de ADN transformado). En determinadas circunstancias los minicromosomas híbridos (que contenían un ARS) eran capaces de recombinar con el genoma de la levadura e integrarse en el mismo (Stinchcomb, Struhl et al. 1979). Esta observación también se realizó en el caso de minicromosomas híbridos que contenían un ARS del rADN, en los

que se observó una alta tasa de integración, posiblemente debido al gran número de copias existentes en el genoma con las que podían recombinar (Szostak and Wu 1979; Larionov, Grishin et al. 1980). Estos minicromosomas híbridos eran muy inestables y se perdían después de 10 o 20 generaciones en ausencia de condiciones selectivas de crecimiento.

La estabilidad mitótica de los minicromosomas híbridos aumentó significativamente mediante la adición de secuencias correspondientes a los centrómeros de los cromosomas (Clarke and Carbon 1980; Stinchcomb, Mann et al. 1982) lo que permite mantener una única copia del minicromosoma por célula. Además, se estableció una relación directa entre la tasa de transformación y su integración en el genoma de la levadura. Bajas frecuencias de transformación se relacionaron entonces con la integración del minicromosoma en el genoma del huésped normalmente por recombinación homóloga (Hinnen, Hicks et al. 1978). En 1982, Szostak y Blackburn descubrieron que secuencias del ADN ribosómico de *Tetrahymena thermophila* podían funcionar como telómeros en levaduras, construyendo así el primer cromosoma artificial que poseía un alto nivel de estabilidad mitótica (Murray and Szostak 1983).

Como ya se ha descrito en la introducción los cromosomas artificiales de levaduras contienen un origen de replicación, ARS, secuencias de ADN centromérico, CEN, y secuencias de ADN telomérico, TEL, que les confieren una alta tasa de estabilidad. En nuestro caso, la tasa de transformación del pYAC_MEM fue considerablemente elevada, 2300 colonias por μg de ADN transformado y siempre mantenidos en condiciones de auxotrofia. En la inmunodetección de comprobación de la transformación (Figura 23A) no se observó hibridación con el ADN genómico, lo que indica la posibilidad de una integración en posteriores ciclos de crecimiento. Para comprobar que las señales obtenidas pertenecían exclusivamente a ADN extracromosómico se realizó en experimento que se muestra en la Figura 28, en la que utilizando el mismo material que en los estudios de los IsR del pYAC_MEM, se hibridó la muestra con dos sondas independientes en un gel analizado de forma unidimensional. La primera de las sondas L1 sólo detectó secuencias del pYAC_MEM, en cambio la segunda sonda, URA3, además de detectar secuencias del pYAC_MEM también hibrida con ADN cromosómico de la levadura. A la vista de los resultados obtenidos se pudo

concluir que los patrones obtenidos en el estudio de iniciación, progresión y terminación de la replicación del minicromosoma circular corresponden al análisis de la replicación de elementos (minicromosomas) extracromosómicos.

5.6 La tensión torsional del cromosoma lineal se disipa por los telómeros permitiendo la segregación en ausencia de Top2.

El paso definitivo en la mayoría de los procesos genéticos es el desenrollamiento de la doble hélice de ADN. Al mismo tiempo, las enormes moléculas de ADN necesitan estar adecuadamente organizadas y compactadas dentro de la célula. Ambos requisitos son muy sensibles y sólo regulables por el estado torsional del ADN.

La topología y la consecuente tensión torsional de una molécula de ADN ha sido bien definida en círculos de dobles hebras de ADN covalentemente cerrados (Vologodskii 1998). El desafío comienza cuando se quieren estudiar cromosomas circulares de gran tamaño de bacterias o cromosomas eucariotas mucho más extensos. El primer problema es que el Lk no puede ser adecuadamente definido. Las hebras de ADN no están topológicamente cerradas en el ADN lineal y, en el caso de grandes círculos de ADN, la medición del Lk es técnicamente impracticable incluso en ausencia de roturas de cadena sencilla. Este problema se supera mediante la suposición generalizada de que largas moléculas de ADN están organizadas en una sucesión de dominios topológicos cerrados. La segunda complicación de la topología del ADN cromosómico proviene de las deformaciones del Tw y Wr y sus interconversiones que dependen principalmente de las múltiples interacciones y tensiones que ocurren en un segmento de ADN y menos de las propiedades intrínsecas de la doble hélice. Es decir, las proteínas de unión a ADN, las interacciones moleculares, las topoisomerasas... afectan a los niveles de tensión torsional de los cromosomas (Roca 2011).

El estrés torsional generado en el ADN se alivia dependiendo de la tasa de difusión de la torsión y la relajación del ADN por parte de las topoisomerasas. En el caso de estrés torsional (+) dependerá también de la capacidad de amortiguación de la

cromatina, ya que normalmente se restringe a superenrollamiento (-). A este respecto, estudios *in vivo* han demostrado que en ausencia de actividad de las topoisomerasas, replicación y transcripción no pueden progresar más de 300 pb (Kim and Wang 1989; Cavalli, Bachmann et al. 1996; Baxter and Diffley 2008). Por consiguiente, conforme la difusión de la torsión del ADN se retrasa por la resistencia al avance rotacional de la cromatina (Nelson 1999), el número de rotaciones axiales que el ADN puede realizar en ausencia de la actividad de las topoisomerasas refleja la capacidad de la cromatina para amortiguar el estrés torsional (+). Por lo tanto, la relajación del ADN mediante las topoisomerasas se convierte en esencial para permitir la transcripción y la replicación.

Roca y colaboradores demostraron que la acumulación de tensión helicoidal (+) en el ADN intracelular provocaba cambios en los patrones del transcriptoma de la levadura. En estas condiciones los niveles de transcripción de los diferentes genes no estaban determinados por su función o por las vías de regulación, sino más bien por la distancia de la localización al final de los cromosomas. Mientras que la gran mayoría de los genes reducían su nivel de transcripción entre 2 y 6 veces, genes localizados a menos de 100 kb del telómero escapaban gradualmente de esta reducción de la transcripción (Joshi, Pina et al. 2010). La general disminución del nivel de transcripción corroboró las observaciones realizadas por Gartenberg y Wang en 1992, quienes observaron que la transcripción estaba disminuida en minicromosomas circulares de levaduras altamente superenrollados (+) (Gartenberg and Wang 1992).

En la presente tesis se ha demostrado, que al igual que Roca y colaboradores observaron la disipación de la tensión helicoidal acumulada por los telómeros en las zonas finales de los cromosomas de levaduras, cromosomas lineales de pequeño tamaño como YAC_MEM (Figura Bloque 35 y 36) se comportan de la misma manera topológicamente, siendo capaces de perder toda su tensión helicoidal por los telómeros. Esta disipación permitió la replicación y la segregación del cromosoma lineal a pesar de la degradación de la Top2, enzima indispensable en la segregación de las cromátidas hermanas. En contraposición al cromosoma circular, pYAC_MEM (Figura 33), que al tratarse de un dominio topológicamente cerrado alberga superenrollamiento, y en ausencia de Top2 no fue capaz de segregar acumulándose en forma de encadenados.

En nuestros días se realizan rutinariamente análisis masivos de la composición, modificaciones bioquímicas y transacciones funcionales de la cromatina, mientras que el estado torsional asociado al ADN se pasa por alto por el hecho de que es más complejo de analizar. Es esencial desarrollar nuevas estrategias que evalúen la dinámica de la conformación del ADN intracelular.

5.7 Los orígenes dormidos promueven la completa replicación del genoma durante la diferenciación.

La replicación en los organismos eucariotas ocurre durante la fase S del ciclo celular y se inicia a partir de orígenes de replicación que se organizan en grupos o "clusters" de varios orígenes adyacentes. Para preservar la integridad del genoma es crucial que estos orígenes estén correctamente regulados y que actúen una única vez en cada ciclo celular.

Las células previenen la re-replicación dividiendo el proceso en dos fases independientes (Blow and Dutta 2005; Arias and Walter 2007). La primera fase consiste en el licenciamiento de los orígenes, comprendido desde la mitosis tardía hasta el final del G1. Las células licencian los orígenes de replicación para utilizarlos en la próxima fase S cargándolos con dos hexámeros de proteínas MCM2-7, formando el complejo "pre-replicativo" (pre-RC) (Diffley 2004; Blow and Dutta 2005). El licenciamiento conlleva la acción coordinada del complejo de reconocimiento de orígenes (ORC) Cdc6 y proteínas Cdt1 (Gillespie, Li et al. 2001), que actúan abrazando el complejo MCM2-7 alrededor del ADN. Durante la fase S se activan los complejos MCM2-7 para formar la parte central de la helicasa que desenrollará el ADN por delante de las horquillas de replicación (Ilves, Petojevic et al. 2010). La segunda fase tiene lugar inmediatamente después de la iniciación de la replicación, en la que conforme los complejos MCM2-7 se desplazan con las horquillas de replicación, los orígenes replicados pasivamente a un estado no licenciado al ser desplazados los complejos MCM2-7. Dado que no pueden cargarse más complejos MCM2-7 una vez que la fase S ha comenzado, ningún origen

puede dispararse más de una vez en cada fase S (Blow and Dutta 2005; Arias and Walter 2007).

La utilidad de un exceso de complejos MCM2-7 se confirma en el denominado licenciamiento de orígenes de replicación dormidos. Estos orígenes poco eficientes no se activan si la replicación transcurre en ausencia de perturbaciones, pero se pueden activar debido al bloqueo o colapso de las horquillas de replicación vecinas en respuesta al estrés replicativo (Woodward, Gohler et al. 2006; Ge, Jackson et al. 2007; Kawabata, Luebben et al. 2011).

En la presente tesis se analizó la replicación durante la diferenciación terminal de las células MEL. Se observó una disminución de la velocidad del avance de las horquillas de replicación (Figura 42) asociada al cese gradual de la replicación propia de la diferenciación. Esto a su vez provocó la activación de orígenes dormidos que se evidenció a través de la reducción de la distancia entre orígenes activos (Figura 42). Se ha sugerido que existe una correlación lineal entre la velocidad de avance de las horquillas y la distancia entre orígenes activos (Anglana, Apiou et al. 2003; Conti, Sacca et al. 2007), y se ha propuesto que es la velocidad de replicación la encargada de regular el disparo de los orígenes.

La utilidad de los orígenes dormidos como una respuesta a la inhibición del avance de las horquillas juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genética. La correcta ejecución de este sistema requiere de la apropiada distribución del exceso de complejos MCM2-7 a lo largo del ADN cromosómico y necesita de la regulación de las factorías de replicación mediante puntos de regulación de quinasas (Blow, Ge et al. 2011).

Las células han evolucionado hacia complejas series de mecanismos que mantienen su integridad genética durante el progreso a través del ciclo celular. Éstos incluyen mecanismos de fidelidad que actúan en las horquillas de replicación, en las vías de reparación del ADN y en los puntos de control que tienen que ver con daño a ADN y la parada de las horquillas. Ahora podemos añadir los orígenes de replicación dormidos a esta lista como otra importante herramienta mediante la cual las células

hacen frente al estrés replicativo. Es tentador especular que las diferentes capacidades de las células para hacer frente al estrés replicativo (como las diferencias existentes entre células normales y cancerosas) pueden ser consecuencia del distinto número de orígenes dormidos que pueden utilizar.

5.8 El silenciamiento de la replicación durante la diferenciación en eucariotas

Como ya se ha comentado en la introducción, en metazoos la diferenciación está asociada a cambios en los patrones de replicación acompañada de variaciones masivas en la expresión de genes, asociadas a remodelaciones en la cromatina. Debido a que las células determinan la localización y el tiempo de iniciación independientemente en cada ciclo celular, es posible que los patrones de la replicación cambien durante la diferenciación. Esta flexibilidad puede permitir rápidas alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina que facilite cambios dramáticos en la expresión génica durante la diferenciación (Aladjem 2007). Existen varios ejemplos en la literatura que ilustran dicha plasticidad.

En células murinas de carcinoma embrionario P19 se produce el silenciamiento de los orígenes de replicación en el dominio del gen HoxB a lo largo de la diferenciación inducida con ácido retinoico (Gregoire, Brodolin et al. 2006). En células P19 no diferenciadas, se detectaron varios sitios de iniciación de la replicación a lo largo de 100 kb del dominio, indicando la relajación en el uso de los orígenes en un estado transcripcionalmente silenciado. Por el contrario, en células inducidas a diferenciación sólo se activa un origen localizado en la frontera del dominio HoxB. Estos resultados demostraron que los cambios en la actividad de iniciación de la replicación no están estrictamente asociados a modificaciones en la transcripción.

Los genes que codifican para las inmunoglobulinas es otro ejemplo de plasticidad en la coordinación entre replicación y expresión génica . Existen evidencias de que una progresiva activación de orígenes específicos se produce en los largos dominios del locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas durante el desarrollo de

linfocitos B (Norio, Kosiyatrakul et al. 2005). Mediante el análisis de moléculas individuales de ADN, Norio y colaboradores demostraron que existen cambios significativos en la iniciación de la replicación sin que se modifique la progresión de las horquillas lo cual explica las variaciones en el tiempo de replicación del locus Igh. Estos y otros ejemplos han llevado a la idea de que las regiones que replican en etapas tempranas del período S coinciden con genes que transcriben mientras que zonas de replicación tardía coinciden con zonas de heterocromatina cuya actividad transcripcional es casi nula.

Rimmelé y colaboradores investigaron la relación entre la replicación del ADN y la proliferación celular mediante modelos leucémicos regulados por la sobreexpresión del factor de transcripción Spi-1/PU.1 (Rimmele, Komatsu et al. 2010). Los resultados demostraron que la activación de Spi-1/PU.1 incrementa la velocidad de replicación afectando a la elongación más que a la activación de orígenes, sin producir daño al ADN. Los resultados obtenidos en la presente tesis relativos a la modificación de la velocidad de avance de las horquillas de replicación durante la diferenciación están en línea con los resultados anteriores y confirman que la velocidad de progresión de las horquillas es un determinante para permitir el disparo de nuevos orígenes de replicación, sin generar daño a ADN (Figura 48).

5.9 El pool de nucleótidos modula la elección del origen y el espacio entre orígenes

En levaduras, la modulación del pool de dNTPs es una manera efectiva de controlar la dinámica de la replicación. En este organismo, se sabe que el punto de regulación de la replicación del ADN controla la actividad de la RNR (Zhao, Muller et al. 1998).

¿Cómo el *pool* de nucleótidos puede afectar a la selección del sitio de iniciación de la replicación en eucariotas? Se pueden valorar tres posibilidades. Primera, la capacidad del complejo de reconocimiento de orígenes para ensamblar los complejos

pre-RCs en zonas específicas del ADN puede depender de los dNTPs, tal como ocurre con el ATP (Bell and Dutta 2002). Segunda, estudios previos han demostrado que la iniciación en un origen podría prevenir la iniciación en un origen idéntico varias kilobases más adelante. Esto sería debido a que el paso de las horquillas de replicación a través de los orígenes previene tanto el ensamblaje como la activación de los complejos pre-RCs (Blow and Dutta 2005; Arias and Walter 2007). Reduciendo la concentración de dNTPs se reduce la tasa de síntesis del ADN, lo que permitiría dar más tiempo a la iniciación de orígenes secundarios. Tercera, la existencia en los pre-RCs de un exceso de MCM2-7 unida a la helicasa que desenrolla el ADN podría producir que algunas helicasas pudieran traslocarse desde zonas de iniciación primaria hacia sitios de iniciación secundarios cuando el pool de dNTPs es bajo (Anglana, Apiou et al. 2003).

Es poco probable que variaciones en el pool de dNTPs por si solas puedan modular la velocidad de avance de las horquillas y la distancia entre orígenes activos en células diferenciadas. En el presente trabajo se ha comprobado mediante un análisis del pool de dNTPs (Figura 47) que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de la subunidad S1 de la RNR desde el estado de proliferación hasta la diferenciación terminal. Por el contrario, los niveles de expresión sí se vieron modificados en presencia de hidroxurea (Figura 47). Esto último es la consecuencia del bloqueo de la síntesis de ADN mediada por la inhibición de la RNR, limitando así el pool de dNTPs disponible para la incorporación en las horquillas de replicación (Karnani and Dutta 2011).

5.10 La heterocromatinización del ADN regula la actividad de los orígenes de replicación

La organización del ADN en forma de cromatina sirve para proteger la información genética así como para proporcionar un medio en el que la célula pueda regular su actividad génica. Históricamente, la cromatina se ha clasificado en dos tipos, eucromatina y heterocromatina. Una característica conservada de la heterocromatina es su replicación tardía durante la fase S, siendo en la mayoría de las ocasiones la última porción del genoma en replicar (Lima-de-Faria and Jaworska 1968). El mecanismo implicado en esta replicación tardía es desconocido hasta el momento. Se sabe que la velocidad de avance de las horquillas a través de la heterocromatina está significativamente disminuida lo que redunda en un enlentecimiento de todo el proceso (Greenfeder and Newlon 1992; Scott, Truong et al. 1997).

Durante la replicación de los cromosomas politénicos de *Drosophila* se ha comprobado la existencia de un patrón temporal de bloqueo de la replicación asociado a la heterocromatina (Leach, Chotkowski et al. 2000). Los datos obtenidos demuestran que existen barreras en la heterocromatina que inhiben el progreso de las horquillas de replicación especialmente a través del llamado ADN satélite.

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de la HP1 α durante la diferenciación terminal de células MEL están en la línea de lo expuesto anteriormente y relacionado con el estado heterocromatinizado del ADN. Los datos sugieren que en células MEL diferenciadas la reducción de la velocidad de avance de las horquillas y la consecuente activación de orígenes dormidos podrían ser consecuencia directa de la progresiva heterocromatinización que caracteriza a la diferenciación terminal.

(Baxter, Sen et al. 2011)

(Estefania, Ganier et al. 2012)

5.11 Los cambios epigenéticos afectan a la replicación en eucariotas

La regulación de la activación de los orígenes y la progresión de las horquillas son parámetros claves que determinan el tiempo de replicación en dominios específicos de los cromosomas. Asimismo, se ha comprobado en levaduras que ciertas modificaciones epigenéticas de las histonas regulan el tiempo de replicación del genoma de la levadura (Vogelauer, Rubbi et al. 2002).

La acetilación de histonas es una de estas modificaciones epigenéticas mediada por la histona deacetilasa (HDAC) que influye en la cromatina mediante la neutralización de cargas positivas de lisinas permitiendo al ADN cargarse de enzimas procesadoras. La hiperacetilación facilita tanto la eliminación de las histonas del ADN molde así como la carga de histonas en el ADN ya replicado (Groth, Rocha et al. 2007). Estudios con inhibidores de la HDAC alteran el patrón de replicación sin modificar los niveles de RNR, afectando directamente a la velocidad de avance de las horquillas siendo más probable que esta variación se deba a cambios en la estructura de la cromatina que a una alteración del pool de dNTPs (Conti, Leo et al. 2010).

Las cohesinas, proteínas involucradas en la unión de cromátidas hermanas, pueden también inhibir la interacción de las maquinarias de transcripción y replicación dificultando el progreso de las mismas a través de la cromatina (Lengronne, McIntyre et al. 2006; Gullerova and Proudfoot 2008; Parelho, Hadjur et al. 2008). Las horquillas de replicación deben superar este bloqueo asociado a las cohesinas para poder duplicar el genoma completo. Defectos en el establecimiento de la cohesión pueden provocar estrés replicativo y senescencia prematura probablemente asociado a una dificultad en la progresión de las horquillas y la consecuente reactivación de orígenes dormidos (Terret, Sherwood et al. 2009).

Estos modelos sugieren que la acetilación de histonas y las cohesinas, así como otros cambios epigenéticos de la cromatina, son moduladores importantes de la activación de orígenes de replicación en eucariotas, que podrían influir a su vez en la diferenciación terminal de las células MEL.

5.12 La programación de los orígenes de replicación y la estructura cromosómica

Las relaciones existentes entre lazos de ADN, replicones y orígenes de replicación se han reavivado en varios estudios recientes. Se ha demostrado que el tamaño del replicón, el cual está dictado por el espacio entre orígenes activos, es idéntico al tamaño de los lazos de ADN en varios animales y plantas, así como durante el desarrollo en *Xenopus* (Buongiorno-Nardelli, Micheli et al. 1982). Cuando se introdujeron núcleos procedentes de células diferenciadas en extractos de huevos de *Xenopus*, se observó que éstos replicaban más lentamente y con un espacio entre orígenes parecido al observado en células somáticas. Esto contrastaba con las distancias cortas entre orígenes características de los embriones de *Xenopus*. (Gurdon 1962). Los replicones en estos casos eran reprogramados mediante el paso a través de mitosis, observación que fue corroborada en células de mamíferos (Courbet, Gay et al. 2008). Estos resultados sugieren que un evento que ocurre en mitosis es esencial para seleccionar los orígenes de replicación que van a ser utilizados en el siguiente ciclo celular, adaptando de esta forma la replicación de los cromosomas al nuevo programa celular. Esto es crucial para la reprogramación de los núcleos durante el desarrollo, y en el caso de la diferenciación terminal de las células MEL, para adaptar la replicación desde el estado proliferativo al diferenciado.

Aún cuando los lazos y los anclajes de los lazos de cromatina no se han definido bioquímicamente, es lícito pensar que la arquitectura cromosómica cumple un papel importante en la localización y activación de los orígenes de replicación.

6 Conclusiones

1. La iniciación de la replicación en cromosomas circulares se produce siempre desde el ARS mientras que en cromosomas lineales los telómeros pueden convertirse en orígenes de replicación espontáneos.
2. La topología existente en las secuencias CEN afecta al movimiento constante de las horquillas de replicación, ralentizando o deteniendo momentáneamente la replicación a su paso.
3. El choque de las maquinarias de replicación y transcripción en el cromosoma circular afecta a la topología de la replicación disminuyendo la velocidad de avance de las horquillas.
4. El cromosoma lineal disipa toda su tensión torsional por los telómeros siendo capaz de segregar en ausencia de Top2. En contraposición al cromosoma circular que al tratarse de un dominio topológicamente cerrado alberga superenrollamiento, y en ausencia de Top2 no es capaz de segregar acumulándose en forma de encadenados.
5. La adquisición de superenrollamiento negativo en eucariotas ocurre de forma repentina justo después de que las hebras nacientes se ligan al finalizar la replicación.
6. Durante la mitosis en eucariotas la formación de los husos mitóticos y la presencia de la condensina Smc2 inducen superenrollamiento positivo en el ADN. Este cambio en superenrollamiento genera una topología en los encadenados del minicromosoma que maximiza la actividad desencadenadora de la Top2.
7. La reprogramación de células MEL hacia su diferenciación terminal va asociada a una disminución de la velocidad de avance de las horquillas cuya consecuencia es la activación de orígenes dormidos.

8. La modificación de la dinámica de la replicación durante la diferenciación terminal podría relacionarse con una reorganización de la cromatina hacia un estado heterocromatinizado.

7 Bibliografia

- Abdurashidova, G., S. Radulescu, et al. (2007). "Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin." *EMBO J* **26**(4): 998-1009.
- Adams, D. E., E. M. Shekhtman, et al. (1992). "The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication." *Cell* **71**(2): 277-288.
- Aladjem, M. I. (2007). "Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans." *Nat Rev Genet* **8**(8): 588-600.
- Alexandrov, A. I., N. R. Cozzarelli, et al. (1999). "Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication." *Genetica* **106**(1-2): 131-140.
- Anglana, M., F. Apiou, et al. (2003). "Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing." *Cell* **114**(3): 385-394.
- Arias, E. E. and J. C. Walter (2007). "Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells." *Genes Dev* **21**(5): 497-518.
- Bartova, E., J. Pachernik, et al. (2007). "Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites." *Histochem Cell Biol* **127**(4): 375-388.
- Bates, A. D. and A. Maxwell (1997). "DNA topology: topoisomerases keep it simple." *Curr Biol* **7**(12): R778-781.
- Bauer, W. and J. Vinograd (1968). "The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye." *Journal of molecular biology* **33**(1): 141-171.
- Bauer, W. R., F. H. Crick, et al. (1980). "Supercoiled DNA." *Sci Am* **243**(1): 100-113.
- Baxter, J. and J. F. Diffley (2008). "Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast." *Mol Cell* **30**(6): 790-802.
- Baxter, J., N. Sen, et al. (2011). "Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes." *Science* **331**(6022): 1328-1332.
- Bell, L. and B. Byers (1983). "Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis." *Anal Biochem* **130**(2): 527-535.
- Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Bell, S. P. and B. Stillman (1992). "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." *Nature* **357**(6374): 128-134.
- Ben-David, Y., E. B. Giddens, et al. (1990). "Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1332-1336.
- Bensimon, A., A. Simon, et al. (1994). "Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface." *Science* **265**(5181): 2096-2098.
- Bhat, M. A., A. V. Philp, et al. (1996). "Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II." *Cell* **87**(6): 1103-1114.
- Blackburn, E. H. (1984). "The molecular structure of centromeres and telomeres." *Annu Rev Biochem* **53**: 163-194.
- Bloom, K. and A. Joglekar (2010). "Towards building a chromosome segregation machine." *Nature* **463**(7280): 446-456.

- Blow, J. J. and A. Dutta (2005). "Preventing re-replication of chromosomal DNA." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 476-486.
- Blow, J. J., X. Q. Ge, et al. (2011). "How dormant origins promote complete genome replication." Trends Biochem Sci **36**(8): 405-414.
- Bonner, W. M., C. E. Redon, et al. (2008). "GammaH2AX and cancer." Nat Rev Cancer **8**(12): 957-967.
- Bouck, D. C. and K. Bloom (2007). "Pericentric chromatin is an elastic component of the mitotic spindle." Curr Biol **17**(9): 741-748.
- Breeden, L. L. (1997). "Alpha-factor synchronization of budding yeast." Methods Enzymol **283**: 332-341.
- Brewer, B. J. and W. L. Fangman (1987). "The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*." Cell **51**(3): 463-471.
- Brewer, B. J. and W. L. Fangman (1988). "A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes." Cell **55**(4): 637-643.
- Brown, P. O. and N. R. Cozzarelli (1981). "Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 843-847.
- Buongiorno-Nardelli, M., G. Micheli, et al. (1982). "A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome." Nature **298**(5869): 100-102.
- Caddle, M. S. and M. P. Calos (1994). "Specific initiation at an origin of replication from *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Cell Biol **14**(3): 1796-1805.
- Cavalli, G., D. Bachmann, et al. (1996). "Inactivation of topoisomerases affects transcription-dependent chromatin transitions in rDNA but not in a gene transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **15**(3): 590-597.
- Celniker, S. E., K. Sweder, et al. (1984). "Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **4**(11): 2455-2466.
- Clarke, L. and J. Carbon (1980). "Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes." Nature **287**(5782): 504-509.
- Clarke, L. and J. Carbon (1985). "The structure and function of yeast centromeres." Annu Rev Genet **19**: 29-55.
- Clayton, D. A. and J. Vinograd (1967). "Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes." Nature **216**(5116): 652-657.
- Coelho, P. A., J. Queiroz-Machado, et al. (2003). "Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis." J Cell Sci **116**(Pt 23): 4763-4776.
- Conti, C., E. Leo, et al. (2010). "Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage." Cancer Res **70**(11): 4470-4480.
- Conti, C., B. Sacca, et al. (2007). "Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells." Mol Biol Cell **18**(8): 3059-3067.
- Courbet, S., S. Gay, et al. (2008). "Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells." Nature **455**(7212): 557-560.
- Cozzarelli, N. R. (1980). "DNA gyrase and the supercoiling of DNA." Science **207**(4434): 953-960.

- Crisona, N. J., T. R. Strick, et al. (2000). "Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. coli topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements." Genes Dev **14**(22): 2881-2892.
- Cuvier, O. and T. Hirano (2003). "A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation." J Cell Biol **160**(5): 645-655.
- Cuylen, S. and C. H. Haering (2011). "Deciphering condensin action during chromosome segregation." Trends Cell Biol **21**(9): 552-559.
- Champoux, J. J. (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Annu Rev Biochem **70**: 369-413.
- Chang, F., J. F. Theis, et al. (2008). "Analysis of chromosome III replicators reveals an unusual structure for the ARS318 silencer origin and a conserved WTW sequence within the origin recognition complex binding site." Mol Cell Biol **28**(16): 5071-5081.
- Cheeseman, I. M. and A. Desai (2008). "Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 33-46.
- Chung, H. M., C. Shea, et al. (1990). "Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of telomeres and mini-chromosomes." EMBO J **9**(8): 2611-2619.
- Dai, J., R. Y. Chuang, et al. (2005). "DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 337-342.
- Delius, H. and A. Worcel (1974). "Letter: Electron microscopic visualization of the folded chromosome of *Escherichia coli*." Journal of molecular biology **82**(1): 107-109.
- Deng, Z., J. Dheekollu, et al. (2007). "The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation." Curr Biol **17**(22): 1989-1995.
- DePamphilis, M. L. (1997). "The search for origins of DNA replication." Methods **13**(3): 211-219.
- Deshpande, A. M. and C. S. Newlon (1996). "DNA replication fork pause sites dependent on transcription." Science **272**(5264): 1030-1033.
- Dhar, M. K., S. Sehgal, et al. (2012). "Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements." Res Microbiol **163**(4): 243-253.
- Diffley, J. F. (2004). "Regulation of early events in chromosome replication." Curr Biol **14**(18): R778-786.
- DiNardo, S., K. Voelkel, et al. (1984). "DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(9): 2616-2620.
- Dohmen, R. J., P. Wu, et al. (1994). "Heat-inducible degtron: a method for constructing temperature-sensitive mutants." Science **263**(5151): 1273-1276.
- Dubey, D. D., S. M. Kim, et al. (1996). "Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin." Curr Biol **6**(4): 467-473.
- Eissenberg, J. C., I. L. Cartwright, et al. (1985). "Selected topics in chromatin structure." Annu Rev Genet **19**: 485-536.
- Eissenberg, J. C. and S. C. Elgin (2000). "The HP1 protein family: getting a grip on chromatin." Curr Opin Genet Dev **10**(2): 204-210.

- Engstrom, Y., S. Eriksson, et al. (1985). "Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits." *J Biol Chem* **260**(16): 9114-9116.
- Esposito, F. and R. R. Sinden (1988). "DNA supercoiling and eukaryotic gene expression." *Oxf Surv Eukaryot Genes* **5**: 1-50.
- Estefania, M. M., O. Ganier, et al. (2012). "DNA replication fading as proliferating cells advance in their commitment to terminal differentiation." *Sci Rep* **2**: 279.
- Fernández-Nestosa, M. J., P. Hernández, et al. (2008). "PU.1 is dispensable to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells." *Leuk Res* **32**(1): 121-130.
- Fitzgerald-Hayes, M., L. Clarke, et al. (1982). "Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs." *Cell* **29**(1): 235-244.
- Freedlender, E. F., L. Taichman, et al. (1977). "Nonrandom distribution of chromosomal proteins during cell replication." *Biochemistry* **16**(9): 1802-1808.
- Freeman, L., L. Aragon-Alcaide, et al. (2000). "The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA." *J Cell Biol* **149**(4): 811-824.
- Freeman, L. A. and W. T. Garrard (1992). "DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2**(2): 165-209.
- Friedman, E. A. and C. L. Schildkraut (1977). "Terminal differentiation in cultured Friend erythroleukemia cells." *Cell* **12**(4): 901-913.
- Friedman, K. L. and B. J. Brewer (1995). "Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis." *Methods Enzymol* **262**: 613-627.
- Friend, C., M. C. Patuleia, et al. (1966). "Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells." *Natl Cancer Inst Monogr* **22**: 505-522.
- Funabiki, H., I. Hagan, et al. (1993). "Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast." *J Cell Biol* **121**(5): 961-976.
- Funnell, B. E., T. A. Baker, et al. (1987). "In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the Escherichia coli chromosome." *J Biol Chem* **262**(21): 10327-10334.
- Furuyama, T. and S. Henikoff (2009). "Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils." *Cell* **138**(1): 104-113.
- Gangloff, S., J. P. McDonald, et al. (1994). "The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase." *Mol Cell Biol* **14**(12): 8391-8398.
- Gartenberg, M. R. and J. C. Wang (1992). "Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11461-11465.
- Ge, X. Q., D. A. Jackson, et al. (2007). "Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress." *Genes Dev* **21**(24): 3331-3341.
- Geller, R., R. Levenson, et al. (1978). "Significance of the cell cycle in commitment of murine erythroleukemia cells to erythroid differentiation." *J Cell Physiol* **95**(2): 213-222.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, et al. (1976). "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(11): 3872-3876.

- Germond, J. E., B. Hirt, et al. (1975). "Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1843-1847.
- Giaever, G. N. and J. C. Wang (1988). "Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells." Cell **55**(5): 849-856.
- Gilbert, D. M. (2004). "In search of the holy replicator." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 848-855.
- Gilson, E. and V. Geli (2007). "How telomeres are replicated." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 825-838.
- Gillespie, P. J., A. Li, et al. (2001). "Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins." BMC Biochem **2**: 15.
- Goshima, G. and M. Yanagida (2000). "Establishing biorientation occurs with precocious separation of the sister kinetochores, but not the arms, in the early spindle of budding yeast." Cell **100**(6): 619-633.
- Goto, T. and J. C. Wang (1985). "Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7178-7182.
- Greenfeder, S. A. and C. S. Newlon (1992). "Replication forks pause at yeast centromeres." Mol Cell Biol **12**(9): 4056-4066.
- Gregoire, D., K. Brodolin, et al. (2006). "HoxB domain induction silences DNA replication origins in the locus and specifies a single origin at its boundary." EMBO Rep **7**(8): 812-816.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-413.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1987). "The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity." Cell **51**(6): 887-898.
- Groth, A., W. Rocha, et al. (2007). "Chromatin challenges during DNA replication and repair." Cell **128**(4): 721-733.
- Gullerova, M. and N. J. Proudfoot (2008). "Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*." Cell **132**(6): 983-995.
- Gurdon, J. B. (1962). "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles." J Embryol Exp Morphol **10**: 622-640.
- Hanai, R. and J. Roca (1999). "Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of DNA topoisomers." Methods Mol Biol **94**: 19-27.
- Hand, R. (1978). "Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication." Cell **15**(2): 317-325.
- Hansen, R. S., S. Thomas, et al. (2010). "Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 139-144.
- Hardy, C. D., N. J. Crisona, et al. (2004). "Disentangling DNA during replication: a tale of two strands." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **359**(1441): 39-47.
- Harmon, F. G., R. J. DiGate, et al. (1999). "RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination." Mol Cell **3**(5): 611-620.
- Hayama, R. and K. J. Mariani (2010). "Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(44): 18826-18831.

- Heichinger, C., C. J. Penkett, et al. (2006). "Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins." *EMBO J* **25**(21): 5171-5179.
- Hernandez, P., L. Martin-Parras, et al. (1993). "Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes." *EMBO J* **12**(4): 1475-1485.
- Herrick, J. and A. Bensimon (2009). "Introduction to molecular combing: genomics, DNA replication, and cancer." *Methods Mol Biol* **521**: 71-101.
- Hinnen, A., J. B. Hicks, et al. (1978). "Transformation of yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(4): 1929-1933.
- Hirano, T. (2000). "Chromosome cohesion, condensation, and separation." *Annu Rev Biochem* **69**: 115-144.
- Hirano, T. (2005). "Condensins: organizing and segregating the genome." *Curr Biol* **15**(7): R265-275.
- Hirano, T. and T. J. Mitchison (1994). "A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro." *Cell* **79**(3): 449-458.
- Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli." *Gene* **57**(2-3): 267-272.
- Holm, C., T. Goto, et al. (1985). "DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast." *Cell* **41**(2): 553-563.
- Huang, C. C., K. M. Chang, et al. (2011). "Histone H3-variant Cse4-induced positive DNA supercoiling in the yeast plasmid has implications for a plasmid origin of a chromosome centromere." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(33): 13671-13676.
- Huang, J., T. Schlick, et al. (2001). "Dynamics of site juxtaposition in supercoiled DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 968-973.
- Huberman, J. A., L. D. Spotila, et al. (1987). "The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid." *Cell* **51**(3): 473-481.
- Huberman, J. A., J. G. Zhu, et al. (1988). "Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **16**(14A): 6373-6384.
- Hudson, B. and J. Vinograd (1967). "Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria." *Nature* **216**(5116): 647-652.
- Ilves, I., T. Petojevic, et al. (2010). "Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins." *Mol Cell* **37**(2): 247-258.
- Jackson, V. and R. Chalkley (1981). "A new method for the isolation of replicative chromatin: selective deposition of histone on both new and old DNA." *Cell* **23**(1): 121-134.
- Jackson, V., D. Granner, et al. (1976). "Deposition of histone onto the replicating chromosome: newly synthesized histone is not found near the replication fork." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2266-2269.
- Jaenisch, R. and A. J. Levine (1973). "DNA replication of SV40-infected cells. VII. Formation of SV40 catenated and circular dimers." *Journal of molecular biology* **73**(2): 199-212.
- Joshi, R. S., B. Pina, et al. (2010). "Positional dependence of transcriptional inhibition by DNA torsional stress in yeast chromosomes." *EMBO J* **29**(4): 740-748.
- Kaguni, J. M. and A. Kornberg (1984). "Replication initiated at the origin (oriC) of the E. coli chromosome reconstituted with purified enzymes." *Cell* **38**(1): 183-190.
- Karnani, N. and A. Dutta (2011). "The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells." *Genes Dev* **25**(6): 621-633.

- Kato, J., Y. Nishimura, et al. (1990). "New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*." *Cell* **63**(2): 393-404.
- Kawabata, T., S. W. Luebben, et al. (2011). "Stalled fork rescue via dormant replication origins in unchallenged S phase promotes proper chromosome segregation and tumor suppression." *Mol Cell* **41**(5): 543-553.
- Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." *Cell* **116**(2): 259-272.
- Kim, R. A. and J. C. Wang (1989). "Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of molecular biology* **208**(2): 257-267.
- Kimura, K., M. Hirano, et al. (1998). "Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro." *Science* **282**(5388): 487-490.
- Kimura, K. and T. Hirano (1997). "ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation." *Cell* **90**(4): 625-634.
- Kimura, K., V. V. Rybenkov, et al. (1999). "13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation." *Cell* **98**(2): 239-248.
- Krasnow, M. A., A. Stasiak, et al. (1983). "Determination of the absolute handedness of knots and catenanes of DNA." *Nature* **304**(5926): 559-560.
- Krentz, A. D., M. W. Murphy, et al. (2011). "DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary." *Developmental biology* **356**(1): 63-70.
- Kupersztoch, Y. M. and D. R. Helinski (1973). "A catenated DNA molecule as an intermediate in the replication of the resistance transfer factor R6K in *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **54**(4): 1451-1459.
- Kurth, I. and J. Gautier (2010). "Origin-dependent initiation of DNA replication within telomeric sequences." *Nucleic Acids Res* **38**(2): 467-476.
- Kwon, S. H. and J. L. Workman (2008). "The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1." *Mol Cells* **26**(3): 217-227.
- Labib, K., J. F. Diffley, et al. (1999). "G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus." *Nat Cell Biol* **1**(7): 415-422.
- Lachman, H. M. and A. I. Skoultchi (1984). "Expression of c-myc changes during differentiation of mouse erythroleukaemia cells." *Nature* **310**(5978): 592-594.
- Laquerre, S., L. Lagace, et al. (1995). "Evaluation of the expression and intracellular localization of a 44-kDa calmodulin binding protein during exponential growth and quiescence (G0)." *Biochem Cell Biol* **73**(1-2): 91-104.
- Larionov, V. L., A. V. Grishin, et al. (1980). "3 micron DNA - an extrachromosomal ribosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **12**(1-2): 41-49.
- Larsson, L. G., M. Pettersson, et al. (1994). "Expression of mad, mx1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc." *Oncogene* **9**(4): 1247-1252.
- Leach, T. J., H. L. Chotkowski, et al. (2000). "Replication of heterochromatin and structure of polytene chromosomes." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6308-6316.
- Leffak, I. M., R. Grainger, et al. (1977). "Conservative assembly and segregation of nucleosomal histones." *Cell* **12**(3): 837-845.
- Lengronne, A., J. McIntyre, et al. (2006). "Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork." *Mol Cell* **23**(6): 787-799.

- Levac, P. and T. Moss (1996). "Inactivation of topoisomerase I or II may lead to recombination or to aberrant replication termination on both SV40 and yeast 2 micron DNA." Chromosoma **105**(4): 250-260.
- Levine, C., H. Hiasa, et al. (1998). "DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities." Biochim Biophys Acta **1400**(1-3): 29-43.
- Li, Y., N. K. Stewart, et al. (2010). "Escherichia coli condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(44): 18832-18837.
- Liao, S. K. and A. A. Axelrad (1975). "Erythropoietin-independent erythroid colony formation in vitro by hemopoietic cells of mice infected with friend virus." Int J Cancer **15**(3): 467-482.
- Lima-de-Faria, A. and H. Jaworska (1968). "Late DNA synthesis in heterochromatin." Nature **217**(5124): 138-142.
- Liu, L. F. and J. C. Wang (1987). "Supercoiling of the DNA template during transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7024-7027.
- Lopez-estrano, C., J. B. Schwartzman, et al. (1998). "Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA." Journal of molecular biology **277**(2): 249-256.
- Lopez, V., M. L. Martinez-Robles, et al. (2012). "Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication." Nucleic Acids Res **40**(8): 3563-3573.
- Lucas, I., T. Germe, et al. (2001). "Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal." EMBO J **20**(22): 6509-6519.
- Lucchini, R., R. E. Wellinger, et al. (2001). "Nucleosome positioning at the replication fork." EMBO J **20**(24): 7294-7302.
- Luger, K. (2006). "Dynamic nucleosomes." Chromosome Res **14**(1): 5-16.
- Luger, K. and J. C. Hansen (2005). "Nucleosome and chromatin fiber dynamics." Curr Opin Struct Biol **15**(2): 188-196.
- MacAlpine, D. M., H. K. Rodriguez, et al. (2004). "Coordination of replication and transcription along a Drosophila chromosome." Genes Dev **18**(24): 3094-3105.
- Makovets, S., I. Herskowitz, et al. (2004). "Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions." Mol Cell Biol **24**(9): 4019-4031.
- Malik, H. S. and S. Henikoff (2009). "Major evolutionary transitions in centromere complexity." Cell **138**(6): 1067-1082.
- Marchuk, D. and F. S. Collins (1988). "pYAC-RC, a yeast artificial chromosome vector for cloning DNA cut with infrequently cutting restriction endonucleases." Nucleic Acids Res **16**(15): 7743.
- Marians, K. J. (1992). "Prokaryotic DNA replication." Annu Rev Biochem **61**: 673-719.
- Marians, K. J., J. S. Minden, et al. (1986). "Replication of superhelical DNAs in vitro." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **33**: 111-140.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (1994). "Inducing differentiation of transformed cells with hybrid polar compounds: a cell cycle-dependent process." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10251-10254.
- Marks, P. A. and R. A. Rifkind (1978). "Erythroleukemic differentiation." Annu Rev Biochem **47**: 419-448.
- Martin-Parras, L., P. Hernandez, et al. (1991). "Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis." Journal of molecular biology **220**(4): 843-853.

- Martin-Parras, L., I. Lucas, et al. (1998). "Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res* **26**(14): 3424-3432.
- Martinez-Robles, M. L., G. Witz, et al. (2009). "Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes." *Nucleic Acids Res* **37**(15): 5126-5137.
- Mayan-Santos, M. D., M. L. Martinez-Robles, et al. (2007). "DNA is more negatively supercoiled in bacterial plasmids than in minichromosomes isolated from budding yeast." *Electrophoresis* **28**(21): 3845-3853.
- Mechali, M. (2001). "DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics." *Nat Rev Genet* **2**(8): 640-645.
- Miller, K. M., O. Rog, et al. (2006). "Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1." *Nature* **440**(7085): 824-828.
- Minc, E., Y. Allory, et al. (1999). "Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells." *Chromosoma* **108**(4): 220-234.
- Mirkin, E. V. and S. M. Mirkin (2005). "Mechanisms of transcription-replication collisions in bacteria." *Mol Cell Biol* **25**(3): 888-895.
- Miyata, M. and T. Fukumura (1997). "Asymmetrical progression of replication forks just after initiation on Mycoplasma capricolum chromosome revealed by two-dimensional gel electrophoresis." *Gene* **193**(1): 39-47.
- Moreau-Gachelin, F., A. Tavitian, et al. (1988). "Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias." *Nature* **331**(6153): 277-280.
- Murray, A. W. and J. W. Szostak (1983). "Construction of artificial chromosomes in yeast." *Nature* **305**(5931): 189-193.
- Murray, A. W. and J. W. Szostak (1983). "Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast." *Cell* **34**(3): 961-970.
- Nasmyth, K. and C. H. Haering (2005). "The structure and function of SMC and kleisin complexes." *Annu Rev Biochem* **74**: 595-648.
- Nelson, P. (1999). "Transport of torsional stress in DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14342-14347.
- Newlon, C. S. and J. F. Theis (1993). "The structure and function of yeast ARS elements." *Curr Opin Genet Dev* **3**(5): 752-758.
- Nitiss, J. L. (2009). "DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions." *Nat Rev Cancer* **9**(5): 327-337.
- Norio, P., S. Kosiyatrakul, et al. (2005). "Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development." *Mol Cell* **20**(4): 575-587.
- Norio, P. and C. L. Schildkraut (2001). "Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes." *Science* **294**(5550): 2361-2364.
- Novick, R. P., K. Smith, et al. (1973). "A catenated intermediate in plasmid replication." *Biochem Biophys Res Commun* **54**(4): 1460-1469.
- Okuno, Y., H. Satoh, et al. (1999). "Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6699-6709.
- Olavarrieta, L., P. Hernandez, et al. (2002). "DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication." *Journal of molecular biology* **322**(1): 1-6.
- Olavarrieta, L., M. L. Martinez-Robles, et al. (2002). "Knotting dynamics during DNA replication." *Mol Microbiol* **46**(3): 699-707.

- Oliveira, R. A., R. S. Hamilton, et al. (2010). "Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei." *Nat Cell Biol* **12**(2): 185-192.
- Palladino, F., T. Laroche, et al. (1993). "SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres." *Cell* **75**(3): 543-555.
- Parelho, V., S. Hadjur, et al. (2008). "Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms." *Cell* **132**(3): 422-433.
- Patel, V. P. and H. F. Lodish (1987). "A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukemia cells into reticulocytes." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 2): 3105-3118.
- Peschle, C., G. Migliaccio, et al. (1980). "Kinetics of erythroid precursors in mice infected with the anemic or the polycythemic strain of Friend leukemia virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4): 2054-2058.
- Peter, B. J., C. Ullsperger, et al. (1998). "The structure of supercoiled intermediates in DNA replication." *Cell* **94**(6): 819-827.
- Pluta, A. F. and V. A. Zakian (1989). "Recombination occurs during telomere formation in yeast." *Nature* **337**(6206): 429-433.
- Postow, L., C. D. Hardy, et al. (2004). "Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome." *Genes Dev* **18**(14): 1766-1779.
- Prado, F. and A. Aguilera (2005). "Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination." *EMBO J* **24**(6): 1267-1276.
- Prescott, D. M. (1976). "The cell cycle and the control of cellular reproduction." *Adv Genet* **18**: 99-177.
- Reichard, P. (1988). "Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis." *Annu Rev Biochem* **57**: 349-374.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, et al. (1999). "Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells." *Genes Dev* **13**(11): 1398-1411.
- Reuben, R. C., R. L. Wife, et al. (1976). "A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(3): 862-866.
- Rifkind, R. A. (1986). "Acute leukemia and cell differentiation." *N Engl J Med* **315**(1): 56-57.
- Rimmele, P., J. Komatsu, et al. (2010). "Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage." *Cancer Res* **70**(17): 6757-6766.
- Robin, C., K. Bollerot, et al. (2009). "Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development." *Cell Stem Cell* **5**(4): 385-395.
- Roca, J. (2011). "The torsional state of DNA within the chromosome." *Chromosoma* **120**(4): 323-334.
- Roca, J. and J. C. Wang (1994). "DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism." *Cell* **77**(4): 609-616.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Russev, G. and R. Hancock (1981). "Formation of hybrid nucleosomes containing new and old histones." *Nucleic Acids Res* **9**(16): 4129-4137.
- Saffery, R., E. Earle, et al. (1999). "Conservation of centromere protein in vertebrates." *Chromosome Res* **7**(4): 261-265.

- Saka, Y., T. Sutani, et al. (1994). "Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis." EMBO J **13**(20): 4938-4952.
- Sakai, A., K. Hizume, et al. (2003). "Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly." EMBO J **22**(11): 2764-2775.
- Sakakibara, Y., K. Suzuki, et al. (1976). "Formation of catenated molecules by replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts." Journal of molecular biology **108**(3): 569-582.
- Santamaria, D., E. Viguera, et al. (2000). "Bi-directional replication and random termination." Nucleic Acids Res **28**(10): 2099-2107.
- Saunders, W. S., C. Chue, et al. (1993). "Molecular cloning of a human homologue of Drosophila heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity." J Cell Sci **104** (Pt 2): 573-582.
- Scott, R. S., K. Y. Truong, et al. (1997). "Replication initiation and elongation fork rates within a differentially expressed human multicopy locus in early S phase." Nucleic Acids Res **25**(22): 4505-4512.
- Schubeler, D., D. Scalzo, et al. (2002). "Genome-wide DNA replication profile for Drosophila melanogaster: a link between transcription and replication timing." Nat Genet **32**(3): 438-442.
- Schvartzman, J. B., S. Adolph, et al. (1990). "Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of bovine papillomavirus type 1 DNA." Mol Cell Biol **10**(6): 3078-3086.
- Schvartzman, J. B. and A. Stasiak (2004). "A topological view of the replicon." EMBO Rep **5**(3): 256-261.
- Seale, R. L. (1976). "Studies on the mode of segregation of histone nu bodies during replication in HeLa cells." Cell **9**(3): 423-429.
- Sfeir, A., S. T. Kosiyatrakul, et al. (2009). "Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication." Cell **138**(1): 90-103.
- Shampay, J. and E. H. Blackburn (1989). "Tetrahymena micronuclear sequences that function as telomeres in yeast." Nucleic Acids Res **17**(8): 3247-3260.
- Shampay, J., J. W. Szostak, et al. (1984). "DNA sequences of telomeres maintained in yeast." Nature **310**(5973): 154-157.
- Sheinin, R. and J. Humbert (1978). "Some aspects of eukaryotic DNA replication." Annu Rev Biochem **47**: 277-316.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae." Genetics **122**(1): 19-27.
- Simpson, R. T. (1978). "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones." Biochemistry **17**(25): 5524-5531.
- Sinden, R. R. and D. E. Pettijohn (1981). "Chromosomes in living Escherichia coli cells are segregated into domains of supercoiling." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 224-228.
- Singer, D., M. Cooper, et al. (1974). "Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(7): 2668-2670.
- Singh, P. B., J. R. Miller, et al. (1991). "A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants." Nucleic Acids Res **19**(4): 789-794.

- Sogo, J. M., H. Stahl, et al. (1986). "Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures." Journal of molecular biology **189**(1): 189-204.
- Sogo, J. M., A. Stasiak, et al. (1999). "Formation of knots in partially replicated DNA molecules." Journal of molecular biology **286**(3): 637-643.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." Journal of molecular biology **98**(3): 503-517.
- Spiro, C., B. Gliniak, et al. (1988). "A tagged helper-free Friend virus causes clonal erythroblast immortality by specific proviral integration in the cellular genome." J Virol **62**(11): 4129-4135.
- Srivatsan, A., A. Tehrani, et al. (2010). "Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity." PLoS Genet **6**(1): e1000810.
- St-Pierre, J., M. Douziech, et al. (2009). "Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity." Mol Cell **34**(4): 416-426.
- Stephens, A. D., J. Haase, et al. (2011). "Cohesin, condensin, and the intramolecular centromere loop together generate the mitotic chromatin spring." J Cell Biol **193**(7): 1167-1180.
- Stinchcomb, D. T., C. Mann, et al. (1982). "Centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of molecular biology **158**(2): 157-190.
- Stinchcomb, D. T., K. Struhl, et al. (1979). "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator." Nature **282**(5734): 39-43.
- Struhl, K., D. T. Stinchcomb, et al. (1979). "High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1035-1039.
- Szostak, J. W. and E. H. Blackburn (1982). "Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors." Cell **29**(1): 245-255.
- Szostak, J. W. and R. Wu (1979). "Insertion of a genetic marker into the ribosomal DNA of yeast." Plasmid **2**(4): 536-554.
- Takebayashi, S., K. Sugimura, et al. (2005). "Regulation of replication at the R/G chromosomal band boundary and pericentromeric heterochromatin of mammalian cells." Exp Cell Res **304**(1): 162-174.
- Tanaka, S. and J. F. Diffley (2002). "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase." Nat Cell Biol **4**(3): 198-207.
- Tanaka, T., J. Fuchs, et al. (2000). "Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation." Nat Cell Biol **2**(8): 492-499.
- Tapper, D. P. and M. L. DePamphilis (1980). "Preferred DNA sites are involved in the arrest and initiation of DNA synthesis during replication of SV40 DNA." Cell **22**(1 Pt 1): 97-108.
- Tatsumi, Y., K. Ezura, et al. (2008). "Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres." Genes Cells **13**(10): 1045-1059.
- Terret, M. E., R. Sherwood, et al. (2009). "Cohesin acetylation speeds the replication fork." Nature **462**(7270): 231-234.
- Theis, J. F. and C. S. Newlon (1994). "Domain B of ARS307 contains two functional elements and contributes to chromosomal replication origin function." Mol Cell Biol **14**(11): 7652-7659.

- Thrash, C., A. T. Bankier, et al. (1985). "Cloning, characterization, and sequence of the yeast DNA topoisomerase I gene." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4374-4378.
- Tonin, P. N., R. L. Stallings, et al. (1987). "Chromosomal assignment of amplified genes in hydroxyurea-resistant hamster cells." Cytogenet Cell Genet **45**(2): 102-108.
- Tsiftoglou, A. S. and S. H. Robinson (1985). "Differentiation of leukemic cell lines: a review focusing on murine erythroleukemia and human HL-60 cells." Int J Cell Cloning **3**(6): 349-366.
- Tye, B. K. (1999). "MCM proteins in DNA replication." Annu Rev Biochem **68**: 649-686.
- Uhlmann, F., D. Wernic, et al. (2000). "Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast." Cell **103**(3): 375-386.
- Vanegas, N., A. García-Sacristán, et al. (2003). "Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells." Leuk Res **27**(7): 607-615.
- Varshavsky, A. J., V. V. Bakayev, et al. (1976). "Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1." Nucleic Acids Res **3**(2): 477-492.
- Vashee, S., C. Cvetič, et al. (2003). "Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex." Genes Dev **17**(15): 1894-1908.
- Viguera, E., A. Rodríguez, et al. (1998). "A computer model for the analysis of DNA replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis." Gene **217**(1-2): 41-49.
- Vinograd, J., J. Lebowitz, et al. (1965). "The twisted circular form of polyoma viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **53**(5): 1104-1111.
- Vogelauer, M., L. Rubbi, et al. (2002). "Histone acetylation regulates the time of replication origin firing." Mol Cell **10**(5): 1223-1233.
- Vologodskii, A. (1998). "Exploiting circular DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4092-4093.
- Vologodskii, A. V. and N. R. Cozzarelli (1994). "Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 609-643.
- Wallis, J. W., G. Chrebet, et al. (1989). "A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase." Cell **58**(2): 409-419.
- Wang, J. C. (1971). "Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega." Journal of molecular biology **55**(3): 523-533.
- Wang, J. C. (1996). "DNA topoisomerases." Annu Rev Biochem **65**: 635-692.
- Wang, J. C. (1998). "Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine." Q Rev Biophys **31**(2): 107-144.
- Wang, J. C., L. J. Peck, et al. (1983). "DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **47 Pt 1**: 85-91.
- Wang, J. D., M. B. Berkmen, et al. (2007). "Genome-wide coorientation of replication and transcription reduces adverse effects on replication in *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5608-5613.
- Wasserman, S. A. and N. R. Cozzarelli (1985). "Determination of the stereostructure of the product of Tn3 resolvase by a general method." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1079-1083.

- Wieland, G., S. Orthaus, et al. (2004). "Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **24**(15): 6620-6630.
- Wiesendanger, B., R. Lucchini, et al. (1994). "Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA." Nucleic Acids Res **22**(23): 5038-5046.
- Woodward, A. M., T. Gohler, et al. (2006). "Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress." J Cell Biol **173**(5): 673-683.
- Wreggett, K. A., F. Hill, et al. (1994). "A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin." Cytogenet Cell Genet **66**(2): 99-103.
- Wu, H. Y., S. H. Shyy, et al. (1988). "Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template." Cell **53**(3): 433-440.
- Yamaguchi, H., K. Kubota, et al. (2000). "Preparation of DNA catenanes and observation of their topological structures by atomic force microscopy." Nucleic Acids Symp Ser(44): 229-230.
- Yoshimoto, M., H. Kambe-Honjoh, et al. (1986). "Early replicative intermediates of *Escherichia coli* chromosome isolated from a membrane complex." EMBO J **5**(4): 787-791.
- Yoshimoto, M., K. Nagai, et al. (1986). "Asymmetric replication of an oriC plasmid in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **204**(2): 214-220.
- Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, et al. (1997). "Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*." Genes Dev **11**(19): 2580-2592.
- Zhang, J., M. S. Randall, et al. (2006). "Role of erythropoietin receptor signaling in Friend virus-induced erythroblastosis and polycythemia." Blood **107**(1): 73-78.
- Zhang, P., X. Zhang, et al. (2000). "PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding." Blood **96**(8): 2641-2648.
- Zhao, X., E. G. Muller, et al. (1998). "A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools." Mol Cell **2**(3): 329-340.
- Zhu, L. and A. I. Skoultschi (2001). "Coordinating cell proliferation and differentiation." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 91-97.

8 Publicaciones

- Baxter, J., N. Sen, et al. (2011). "Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes." Science **331**(6022): 1328-1332.
- Estefanía, M. M., O. Ganier, et al. (2012). "DNA replication fading as proliferating cells advance in their commitment to terminal differentiation." Sci Rep **2**: 279.
- Fernández Nestosa, M. J., Monturus, E et al (2013). "DNA methylation-mediated silencing of PU.1 in leukemia cells resistant to cell differentiation." En revisión.

